

Aus dem Lehrstuhl  
für Zahnärztliche Prothetik  
Prof. Dr. Gerhard Handel  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

*Untersuchungen zur initialen Biofilmbildung von koaggregierenden  
oralen Keimen an zahnärztlichen Werkstoffen in vitro*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Birgit Verena Wislsperger

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sebastian Hahnel
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Andreas Faltermeier

Tag der mündlichen Prüfung: 13. März 2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1	Überblick . . . . .	3
2.2	Mundflora, Speichel und Plaque . . . . .	3
2.2.1	Keime – Einteilung und Eigenschaften . . . . .	4
2.2.1.1	Allgemeines . . . . .	4
2.2.1.2	Streptokokken . . . . .	4
2.2.1.3	Aktinomyzeten . . . . .	6
2.2.2	Speichel und Pellikel . . . . .	7
2.2.2.1	Bestandteile und Aufgaben des Speichels . . . . .	7
2.2.2.2	Entstehung der Pellikel . . . . .	9
2.2.2.3	Bedeutung der Pellikel . . . . .	12
2.2.3	Vom initialen Biofilm zur Plaque . . . . .	15
2.2.3.1	Interaktion von Bakterien und (pellikelbedeckten) Grenzflächen . . . . .	15
2.2.3.2	Plaque . . . . .	23
2.2.4	Eigenschaften und gegenseitige Beeinflussung von <i>Streptococcus gordonii</i> und <i>Actinomyces naeslundii</i> . . . . .	30
2.3	Untersuchte Werkstoffe – Struktur und Eigenschaften . . . . .	33
2.3.1	Nichtedelmetalllegierungen . . . . .	33
2.3.1.1	Allgemeines . . . . .	33
2.3.1.2	Girobond®NB – eine CoCrMo-Legierung . . . . .	34
2.3.2	Keramik . . . . .	35
2.3.2.1	Allgemeines . . . . .	35
2.3.2.2	IPS Empress®2 – eine Glaskeramik . . . . .	37
2.3.3	Zahnärztliche Polymere . . . . .	38
2.3.3.1	Allgemeines . . . . .	38
2.3.3.2	Sinfony™ – ein Verblendkunststoff . . . . .	39

2.3.3.3	Palapress®Vario – ein Prothesenkunststoff . . . . .	41
---------	---	----

### 3 Material und Methode 43

3.1	Fragestellung . . . . .	43
3.2	Untersuchte Werkstoffe und Speichellösungen . . . . .	44
3.2.1	Werkstoffe und Prüfkörper . . . . .	44
3.2.1.1	Herstellung . . . . .	44
3.2.1.2	Nachbearbeitung . . . . .	45
3.2.1.3	Messung der Rauigkeit mittels Profilometrie . . . . .	45
3.2.1.4	Vorbereitung . . . . .	46
3.2.1.5	Wiederverwendung . . . . .	46
3.2.2	Speichellösungen . . . . .	46
3.2.2.1	Natürlicher Speichel . . . . .	47
3.2.2.2	Künstlicher Speichel . . . . .	47
3.2.2.3	PBS („Phosphate Buffered Saline“) . . . . .	47
3.3	Versuchsdurchführung . . . . .	48
3.3.1	Überblick . . . . .	48
3.3.2	Bakterien . . . . .	48
3.3.2.1	Medium . . . . .	49
3.3.2.2	Kultivierung . . . . .	49
3.3.3	Vorversuche . . . . .	51
3.3.3.1	Wachstumskurven . . . . .	51
3.3.3.2	Zellzahlbestimmung . . . . .	51
3.3.4	Hauptversuche . . . . .	51
3.3.4.1	Parameter-Kombinationen und Versuchsreihen . . . . .	52
3.3.4.2	Biofilmbildung unter semistatischen Bedingungen . . . . .	53
3.3.4.3	CytoX-Violet™ . . . . .	56
3.3.4.4	Biofilmbildung unter dynamischen Bedingungen . . . . .	56
3.3.4.5	Rasterelektronenmikroskopie . . . . .	58
3.3.4.6	Kontaktwinkelmessung und Bestimmung der freien Oberflächen- energie . . . . .	59
3.4	Datenverarbeitung und statistische Auswertung . . . . .	60
3.4.1	SPSS . . . . .	60
3.4.2	Graphische Darstellung . . . . .	60
3.4.3	Statistik . . . . .	61

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
4.1	Vorversuche . . . . .	63
4.1.1	Wachstumskurven . . . . .	63
4.1.2	Zellzahlbestimmung . . . . .	65
4.2	Kontaktwinkelmessung . . . . .	66
4.3	Hauptversuche . . . . .	68
4.3.1	Versuchsreihe ① . . . . .	69
4.3.1.1	Einfluss der Inkubationszeit auf die Adhäsion/Biofilmbildung .	70
4.3.1.2	Adhäsion/Biofilmbildung der verschiedenen Keime im Vergleich	73
4.3.1.3	Vergleich der bakteriellen Adhäsion/Biofilmbildung an pellikelbedeckte und nicht pellikelbedeckte Prüfkörper . . . . .	76
4.3.1.4	Vergleich der bakteriellen Adhäsion/Biofilmbildung an Palapress und Glas . . . . .	79
4.3.2	Versuchsreihe ② . . . . .	80
4.3.2.1	Vergleich der bakteriellen Adhäsion an glattes und raues Palapress	81
4.3.2.2	Adhäsion der verschiedenen Keime im Vergleich . . . . .	84
4.3.2.3	Vergleich der bakteriellen Adhäsion an pellikelbedeckte und nicht pellikelbedeckte Prüfkörper . . . . .	86
4.3.3	Versuchsreihe ③ . . . . .	88
4.3.3.1	Vergleich der bakteriellen Adhäsion an Empress, Sinfony und Girobond . . . . .	89
4.3.3.2	Adhäsion der verschiedenen Keime im Vergleich . . . . .	91
4.3.3.3	Vergleich der bakteriellen Adhäsion an pellikelbedeckte und nicht pellikelbedeckte Prüfkörper . . . . .	93
4.3.4	Fließkammer . . . . .	95
4.3.4.1	Vergleich der bakteriellen Adhäsion an Empress, Sinfony und Girobond . . . . .	96
4.3.4.2	Vergleich der bakteriellen Adhäsion unter dynamischen und semistatischen Bedingungen . . . . .	97
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>99</b>
5.1	Diskussion der Methoden . . . . .	99
5.1.1	Biofilmbildung <i>in vivo</i> vs. <i>in vitro</i> . . . . .	99
5.1.2	Auswahl und Verarbeitung der Materialien . . . . .	101
5.1.3	Auswahl, Kultivierung und Inkubation der Keime . . . . .	103
5.1.4	Experimentelle Pellikelbildung . . . . .	108

5.1.5	Biofilmbildung unter semistatischen Bedingungen . . . . .	111
5.1.6	Quantifizierung der adhärenen Mikroorganismen . . . . .	114
5.2	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	117
5.2.1	Einfluss des Keims und der Inkubationszeit auf die Adhäsion/Biofilmbildung	118
5.2.2	Einfluss der Speichelpellikel auf die Adhäsion/Biofilmbildung . . . . .	124
5.2.3	Einfluss der Rauigkeit auf die Adhäsion/Biofilmbildung . . . . .	127
5.2.4	Einfluss der Werkstoffchemie auf die Adhäsion/Biofilmbildung . . . . .	131
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>139</b>
<b>7</b>	<b>Resümee und Ausblick</b>	<b>141</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>169</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>171</b>

# Abbildungsverzeichnis

2.1	DLVO-Theorie . . . . .	18
2.2	Plaque . . . . .	27
3.1	Poliermaschine . . . . .	45
3.2	Perthometer . . . . .	45
3.3	Thermoschüttelgerät . . . . .	50
3.4	Photometer . . . . .	50
3.5	Fluorometer . . . . .	54
3.6	Versuchsübersicht . . . . .	55
3.7	Fließkammer . . . . .	57
3.8	Kontaktwinkel $\theta$ . . . . .	59
3.9	Beispielgraph . . . . .	61
4.1	Wachstumskurven . . . . .	63
4.2	Vergleich der totalen freien Oberflächenenergien und ihrer Komponenten . . . .	67
4.3	Versuchsreihe ①; Material und Inkubationszeit . . . . .	70
4.4	Versuchsreihe ①; REM: Inkubationszeit . . . . .	72
4.5	Versuchsreihe ①; Material und Keim . . . . .	73
4.6	Versuchsreihe ①; REM: Keim . . . . .	75
4.7	Versuchsreihe ①; Material und Pellikel . . . . .	77
4.8	Versuchsreihe ①; REM: Pellikel . . . . .	78
4.9	Versuchsreihe ①; REM: Material . . . . .	80
4.10	Versuchsreihe ②; Material, Rauigkeit und Keim . . . . .	81
4.11	Versuchsreihe ②; REM: Material . . . . .	83
4.12	Versuchsreihe ②; REM: Keim . . . . .	85
4.13	Versuchsreihe ②; Material, Rauigkeit und Pellikel . . . . .	86
4.14	Versuchsreihe ②; REM: Pellikel . . . . .	88
4.15	Versuchsreihe ③; Material und Keim . . . . .	89
4.16	Versuchsreihe ③; REM: Material . . . . .	90

4.17 Versuchsreihe ③; REM: Keim . . . . .	92
4.18 Versuchsreihe ③; Material und Pelikel . . . . .	93
4.19 Versuchsreihe ③; REM: Pelikel . . . . .	95
4.20 Relative Fluoreszenzintensitäten unter dynamischen und semistatischen Versuchs- bedingungen . . . . .	96



# Tabellenverzeichnis

3.1	Versuchsreihe ① . . . . .	52
3.2	Versuchsreihe ② . . . . .	52
3.3	Versuchsreihe ③ . . . . .	52
3.4	Übersicht über die Hauptversuche . . . . .	53
3.5	Oberflächenenergie der für die Kontaktwinkelmessung verwendeten Flüssigkeiten	60
4.1	Koloniezahlen nach Ausplattieren der Einzelkulturen bzw. Kokulturen . . . . .	65
4.2	Oberflächenenergien . . . . .	67
4.3	Kontaktwinkelmessung, statistische Auswertung . . . . .	68
4.4	Messwerte Versuchsreihe ① . . . . .	69
4.5	Versuchsreihe ①, statistische Auswertung: Inkubationszeit . . . . .	71
4.6	Versuchsreihe ①, statistische Auswertung: Keim . . . . .	74
4.7	Versuchsreihe ①, statistische Auswertung: Pellikel . . . . .	77
4.8	Versuchsreihe ①, statistische Auswertung: Material . . . . .	79
4.9	Messwerte Versuchsreihe ② Variante (a) . . . . .	81
4.10	Messwerte Versuchsreihe ② Variante (b) . . . . .	81
4.11	Versuchsreihe ② Variante (a), statistische Auswertung: Rauigkeit . . . . .	82
4.12	Versuchsreihe ② Variante (b), statistische Auswertung: Rauigkeit . . . . .	82
4.13	Versuchsreihe ② Variante (a), statistische Auswertung: Keim . . . . .	84
4.14	Versuchsreihe ② Variante (b), statistische Auswertung: Keim . . . . .	84
4.15	Versuchsreihe ②, statistische Auswertung: Pellikel . . . . .	87
4.16	Messwerte Versuchsreihe ③ . . . . .	88
4.17	Versuchsreihe ③, statistische Auswertung: Material . . . . .	89
4.18	Versuchsreihe ③, statistische Auswertung: Keim . . . . .	91
4.19	Versuchsreihe ③, statistische Auswertung: Pellikel . . . . .	94
4.20	Messwerte Fließkammer . . . . .	95
4.21	Fließkammer, statistische Auswertung: Material . . . . .	96
4.22	Fließkammer, statistische Auswertung: Verfahren . . . . .	97



# Kapitel 1

## Einleitung

Sehr viele Menschen in Deutschland haben Erfahrung mit dem Thema Zahnersatz. So ergab die vierte deutsche Mundgesundheitsstudie aus dem Jahr 2005, dass mehr als  $\frac{2}{3}$  der Erwachsenen und nahezu 100% der Senioren prothetisch versorgt waren [112]: 35- bis 44-Jährige tragen fast ausschließlich festsitzenden Zahnersatz in Form von Kronen und/oder Brücken, die 65- bis 74-Jährigen sind zu  $\frac{2}{3}$  mit herausnehmbaren Lösungen versorgt, wobei es sich dabei meist um partielle Prothesen handelt [111, 112]. Die meisten Patienten besitzen also eine Restbezaehlung, die teilweise oder ganz in das prothetische Konzept integriert ist. Ihr Erhalt ist von wesentlicher Bedeutung, denn, wie Untersuchungen zur Zufriedenheit von Zahnersatzträgern zeigen, wird in allen Altersgruppen einer guten und langlebigen Qualität des Zahnersatzes – noch vor Funktionalität und Ästhetik – der größte Stellenwert beigemessen [111]. Dieses Interesse dürften die Patienten mit den Kostenträgern teilen, denn laut Kassenzahnärztlicher Bundesvereinigung (KZBV) mussten allein im Jahr 2009 rund drei Milliarden Euro von den gesetzlichen Krankenkassen aufgebracht werden, um die Kosten für die prothetische Versorgung der deutschen Bevölkerung zu decken [123]. Zwar war die Reparatur von rezementierbarem, festsitzendem Zahnersatz (Befundposition 6.8) an dritter Stelle der am häufigsten abgerechneten Befundpositionen [73, 123], dennoch kommt die Kronen- und Brückenprothetik mit einer Überlebenszeit von bis zu 25 Jahren den Ansprüchen von Patienten und Krankenkassen [131, 190] näher als herausnehmbarer Zahnersatz, der eine mittlere Verweildauer von 8 bis 10 Jahren [185] aufweist. So konnten De Backer *et al.* in einer 2008 veröffentlichten retrospektiven Studie, die sich mit der Verweildauer 4-gliedriger teilweise keramisch verblendeter Brücken aus Goldlegierungen beschäftigte, zeigen, dass nach 20 Jahren noch 68,3% der Brücken intakt waren [47].

Allerdings muss auch erwähnt werden, dass der Studie von De Backer *et al.* zufolge die mittlere Überlebenszeit lediglich bei 11,4 Jahren lag. In 60% aller Fälle, in denen eine Neuankfertigung des Zahnersatzes nötig war, war dies aufgrund von **Sekundärkaries** (erneute Bildung einer Karies im marginalen Bereich einer zahnärztlichen Restauration) erforderlich: sowohl als al-

leinige Ursache (32%) als auch in Kombination mit Retentionsverlust (28%). Ein allein durch Karies bedingtes Versagen der Brücken trat durchschnittlich nach 10,9 Jahren auf [47]. In einer weiteren Veröffentlichung von De Backer *et al.* [46] werden diese Ergebnisse ebenso bestätigt wie von Tan *et al.*, die zeigten, dass Sekundärkaries die häufigste Ursache für einen biologischen Misserfolg von Zahnersatz darstellt [229]. Weiterhin sind oft auch parodontale Komplikationen für den Verlust von Zahnersatz verantwortlich [242]. Biologisch bedingtes Versagen betrifft aber nicht nur festsitzenden Zahnersatz. Wie von Budtz-Jørgensen und Isidor gezeigt wurde, kann insbesondere bei Patienten mit herausnehmbarem Zahnersatz eine gesteigerte Kariesaktivität festgestellt werden [27], die die Notwendigkeit einer kostenintensiven Neuanfertigung oder Erweiterung mit sich bringen kann [57, 181].

Durch eine Vermeidung von Sekundärkaries und Parodontitis könnte also die Überlebenszeit prothetischer Versorgungen verlängert und die für Neuanfertigungen anfallenden Kosten gesenkt werden [139, 179]. Am Auftreten beider Erkrankungen ist ursächlich die dentale Plaque bzw. die in ihr enthaltenen säurebildenden und parodontalpathogenen Mikroorganismen beteiligt [99, 100]. Untersuchungen der dentalen Plaque führten unter anderem zu der Erkenntnis, dass bei der initialen Kolonisierung der Zahnoberfläche bestimmte Spezies (v.a. Streptokokken und Aktinomyzeten) als sogenannte Frühbesiedler eine wichtige Rolle spielen [177]. Anschließend führen Teilungsvorgänge und Mechanismen wie die Koaggregation und Koadhäsion weiterer Mikroorganismen dazu, dass komplex aufgebaute Bakteriennetzwerke entstehen, die für Mikroorganismen ein Biotop mit verbesserten Lebensbedingungen darstellen, da hier unter anderem ungestört Stoffwechselprodukte gebildet, ausgetauscht und transportiert werden können [100]. Diese bakterielle Besiedelung betrifft aber nicht nur natürliche Grenzflächen wie Zähne oder Schleimhäute, sondern auch zahnärztliche Materialien, wie sie z.B. im Rahmen prothetischer Arbeiten in die Mundhöhle eingebracht werden [202]. In etlichen Untersuchungen wurde daher der Frage nachgegangen, ob dabei bestimmte Werkstoffe von Bakterien bevorzugt besiedelt werden, welche Materialeigenschaften hierfür verantwortlich sein könnten und ob es die Möglichkeit gibt, durch Einsatz bestimmter Werkstoffe Sekundärkaries und Parodontitis zu verhindern [55, 94, 126, 140, 225, 230].

In diesem Sinne wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene prothetische Werkstoffe hinsichtlich der Biofilmbildung durch die koaggregierenden oralen Keime *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V untersucht. Desweiteren sollte auch analysiert werden, auf welchen Einflussfaktoren potentielle Unterschiede in der Biofilmbildung beruhen und inwieweit sich die beiden Keime gegenseitig bei der Biofilmbildung beeinflussen.

# Kapitel 2

## Literaturübersicht

### 2.1 Überblick

Das Zusammenwirken von Speichel und Mikroorganismen, die mit mehreren hundert verschiedenen Arten [202] in der menschlichen Mundhöhle vertreten sind, führt durch deren Adhäsion an die aus Speichelbestandteilen entstandene Pellikel zur mikrobiellen Besiedelung sämtlicher natürlicher und nicht natürlicher Oberflächen in Form der dentalen Plaque [45, 94]. Die bei der Plaquebildung ablaufenden Vorgänge sind komplex und unterliegen dem Einfluss mehrerer Faktoren: dabei spielen die Eigenschaften der anwesenden Bakterien, ihre gegenseitige Beeinflussung und die Zusammensetzung des Speichels ebenso eine Rolle wie die Materialeigenschaften der zahnärztlichen Werkstoffe, die bei prothetischen und konservierenden Versorgungen eingesetzt werden [94, 100]. In den folgenden Kapiteln wird ein Überblick über einige relevante orale Keime, die besonderen Eigenschaften des Speichels, die Entstehung des oralen Biofilms und die Eigenschaften der untersuchten Werkstoffe gegeben.

### 2.2 Mundflora, Speichel und Plaque

Die Aufbauten der *in vitro* durchgeführten Versuche der vorliegenden Arbeit orientierten sich an den Bedingungen, wie sie in der Mundhöhle anzutreffen sind. Deshalb sollen zunächst einige physiologische Grundlagen – Speichel, Mundflora sowie die Mechanismen der Adhäsion und gegenseitigen Beeinflussung von Bakterien – beschrieben werden. Dabei wird stets die Bedeutung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Keime *Streptococcus gordonii* und *Actinomyces naeslundii* besonders berücksichtigt.

## 2.2.1 Keime – Einteilung und Eigenschaften

Dementsprechend sehen die folgenden Kapitel von einer Beschreibung der gesamten Mundflora ab und geben lediglich einen Überblick zu Einteilung und Eigenschaften von Streptokokken und Aktinomyzeten.

### 2.2.1.1 Allgemeines

Die Mundhöhle erfährt eine ständige Exposition gegenüber Luft, Nahrung und (somit) Mikroorganismen, die in den anatomisch bedingten Mikrostandorten und dem Milieu der Mundhöhle günstige Lebensbedingungen finden, woraus eine große Anzahl an Besiedlern resultiert [202]. Neben Pilzen, Viren und Protozoen [202] sind dies in erster Linie Bakterien, die man nach ihrem Zellwandaufbau, ihrer Form und Stoffwechselleistung [190] in grampositive Stäbchen, grampositive Kokken, gramnegative Stäbchen und gramnegative Kokken einteilen kann, wobei innerhalb jeder Gruppe in obligate Anaerobier, fakultative Anaerobier und Aerobier differenziert wird. In der Mundhöhle stellen Anaerobier den deutlich größten Teil dar, während Aerobier eine untergeordnete Rolle spielen: Je nach Standort variiert das Verhältnis von Aerobiern zu Anaerobiern von 1:10 bis 1:1000 [202]. Während am Auftreten von parodontalen Erkrankungen obligate Anaerobier beteiligt sind, stehen aus Sicht der Kariesätiologie vor allem die fakultativen Anaerobier im Mittelpunkt des Interesse. Unter den fakultativen Anaerobiern spielen quantitativ, hinsichtlich ihres kariogenen Potentials und ihrer Neigung zur Plaquebildung grampositive Kokken aus der *Streptococcus mutans*- und *Streptococcus mitis*-Gruppe sowie grampositive Stäbchen der Gattungen *Lactobacillus* und *Actinomyces* eine bedeutende Rolle [99, 100, 202].

### 2.2.1.2 Streptokokken

Die Taxonomie des Reiches „Bakterien“ umfasst neun Ränge: Begonnen mit dem Stamm, gelangt man über Klasse, Unterklasse, Ordnung, Unterordnung, Familie und Gattung zur Art, die wiederum in Genospezies und Bakterienstämme unterteilt werden kann [105, 151]. Wenn von Streptokokken gesprochen wird, versteht man darunter die Gattung *Streptococcus*, die ein Mitglied der Familie Streptococcaceae ist und ihrerseits mehr als 30 Arten enthält [202], die sich aufgrund von rRNA-Analysen wiederum in sechs Gruppen (pyogene Streptokokken, *Streptococcus bovis*-, *Streptococcus salivarius*-, *Streptococcus mutans*-, *Streptococcus sanguinis*- bzw. *mitis*- und *Streptococcus anginosus*-Gruppe) einteilen lassen. Streptokokken der vier zuletzt genannten Gruppen werden zusammenfassend als orale Streptokokken bezeichnet [202]. Sie repräsentieren über 20% der oralen Mikroflora [132, 202] und 60 bis 80% der gesamten Bakterienpopulation auf Zahnoberflächen [114], was durch einige besondere Eigenschaften der Streptokokken erklärbar ist (nach [202]):

- Sie besitzen die Fähigkeit, an fast jede in der Natur vorkommende Oberfläche zu adhären.
- Vorhandene Nahrungsquellen können rasch genutzt werden.
- Streptokokken sind sehr tolerant bezüglich der Umgebungsbedingungen: Sie können sich sowohl anaerob als auch aerob vermehren und zeichnen sich unter allen Mikroorganismen durch die geringste Empfindlichkeit gegenüber variierendem Sauerstoffpartialdruck und lokalen Veränderungen aus.
- Es besteht bis zu einem gewissen Grad Resistenz gegenüber dem menschlichen Immunsystem sowie die Möglichkeit, die Wirtsabwehr zu beeinflussen.

Streptokokken besitzen eine Vielfalt an Adhäsionsmolekülen, Fimbrienadhäsinen und Adhäsinsrezeptoren [202], auf der die besonders ausgeprägte Fähigkeit oraler Streptokokken an eine Vielzahl von Substratoberflächen zu adhären und diese zu kolonisieren, beruht. In Kapitel 2.2.3.1 werden die Adhäsionsmechanismen detailliert beschrieben. Zu den Substraten zählen körpereigene Zellen, andere orale Mikroorganismen v.a. andere Kokken, Speichelkomponenten sowie Proteine der extrazellulären Matrix [118,177]. Damit sind sämtliche oralen Oberflächen, also auch Zahnhartsubstanzen und zahnärztliche Restaurationen, von einer Kolonisierung mit Streptokokken betroffen, denn sie alle werden von Speichelkomponenten in Form der Pellikelschicht bedeckt. Die bedeutendsten Pellikelbesiedler stammen aus der *Streptococcus sanguinis*-/*Streptococcus mitis*-Gruppe. Bei ihnen wurde eine Vielzahl an speichelbindenden Adhäsionsmolekülen sowie deren Liganden und Substratmoleküle ermittelt.

Zur *Streptococcus sanguinis*-/*Streptococcus mitis*-Gruppe gehört auch die Art *Streptococcus gordonii* bzw. der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Bakterienstamm *Streptococcus gordonii* DL1 [202]. *Streptococcus gordonii* gehört zu den Viridansstreptokokken und somit zu den Bakterien, die einen Großteil der dentalen Plaque bilden; sie können über das Phosphotransferase-System (PTS) lebensnotwendige Kohlenhydrate in die Zellen einschleusen, mit Hilfe einer Glucosyltransferase Glucanpolymere synthetisieren und diese anschließend über das PTS als extrazelluläre Polysaccharide ausschleusen [99]. Ihre kariogene Wirkung beruht zum einen darauf, dass die von ihnen gebildeten extrazellulären Polysaccharide *Mutans*-Streptokokken als Substrat dienen, zum anderen weisen sie auch bei tiefen pH-Werten azidogene Eigenschaften auf und fördern dadurch die Kolonisierung mit *Mutans*-Streptokokken [202]. *Streptococcus gordonii* gilt als Pionierkeim [129], dem Pellikelbestandteile wie Amylase und Fibronektin als Rezeptoren dienen [95] und der durch seine Rolle in der initialen Phase der Biofilmbildung die Kolonisierung der Zahnoberflächen vorantreibt [136].

### 2.2.1.3 Aktinomyzeten

Als Aktinomyzeten bezeichnet man die Bakterien der Familie Actinomycetaceae, die fünf Gattungen umfasst [208]. Eine von diesen ist die Gattung *Actinomyces*, die, nach Abzug der Streptokokken, ein Drittel aller Bakterien in der supragingivalen Plaque ausmacht [177] und weit mehr als 50 Arten beinhaltet, wovon nur einige wenige in Schleimhautoberflächen, v.a. denen der Mundhöhle, einen geeigneten Lebensraum finden, während die meisten Aktinomyzeten in der freien Natur insbesondere im Erdboden leben. Neben den bekannten Arten *Actinomyces israelii* und *Actinomyces odontolyticus* zählt zu den Besiedlern der Mundhöhle auch *Actinomyces naeslundii* [202].

Diese Art wurde bislang in drei Genospezies – 1,2 und WVA 963 – unterteilt [101]. Aufgrund genauerer Klassifizierungsmöglichkeiten (Vergleich partieller Gensequenzen) konnte eine neue Einteilung und Bezeichnung von *Actinomyces naeslundii* erfolgen: *Actinomyces naeslundii* *genospecies 1* behält seinen Namen und wird jetzt als *Actinomyces naeslundii sensu stricto* bezeichnet, *Actinomyces naeslundii genospecies 2* wurde in *Actinomyces oris* umbenannt und *Actinomyces naeslundii genospecies WVA 963* heißt nun *Actinomyces johnsonii* [52, 101]. Somit ist korrekterweise auch der untersuchte Keim *Actinomyces naeslundii T14V* neu einzuordnen: Als Mitglied der *Actinomyces naeslundii genospecies 2* gehört er jetzt zur Art *Actinomyces oris*. Da dies allerdings erst in neuester Zeit veröffentlicht wurde und somit in älterer Literatur die Recherche unter den aktuellen Begriffen nicht erfolgreich ist, wird in der vorliegenden Arbeit auch noch von *Actinomyces naeslundii* gesprochen – ebenso wie in nahezu allen in dieser Arbeit zitierten Publikationen –, wobei diese Bezeichnung im bisherigen Sinn verwendet wird. Wenn also der Begriff *Actinomyces naeslundii* erwähnt wird, sind damit auch die neu entdeckten Arten *Actinomyces johnsonii* und *Actinomyces oris* inbegriffen.

*Actinomyces naeslundii* (und weitere *Actinomyces*-Arten) findet man als erfolgreiche Pellikelkolonisten, die sich sehr gut an stark veränderliche lokale Bedingungen anpassen können, auf sämtlichen pellikelbedeckten oralen Oberflächen [202]. Der Keim wächst am besten bei der normalen menschlichen Körpertemperatur von 37 °C, wird in großer Zahl in der menschlichen Mundhöhle und der dentalen Plaque gefunden und mit Wurzelkaries sowie parodontalen Erkrankungen in Verbindung gebracht [65, 202]. Wie alle oralen *Actinomyces* fermentiert *Actinomyces naeslundii* Kohlenhydrate zu Säuren und bildet unlösliche extrazelluläre Polysaccharide. Ihre Säuretoleranz und ihr leistungsfähiges Phosphotransferase-Zuckertransportsystem tragen zu ihrer Kariogenität bei [202]. *Actinomyces naeslundii* besitzt Typ-1- und Typ-2-Fimbrien, durch die es an verschiedene Oberflächen binden kann: über Typ-1-Fimbrien vor allem an Zahnoberflächen und Kollagen durch Adhäsion-Rezeptor-Bindung, über Typ-2-Fimbrien an Zuckerreste auf epithelialen und zellulären Oberflächen [38] (zur Oberflächenbindung von *Actinomyces naeslundii*



*dii* vgl. auch Kap. 2.2.3.1). *Actinomyces naeslundii* besitzt viele Enzyme, um Kohlenhydrate zu hydrolysieren sowie die Fähigkeit Ammonium zu produzieren und somit den pH-Wert in seiner Umgebung zu kontrollieren. Das erlaubt ihm, sich schnell an wechselnde Umgebungsbedingungen anzupassen und mit anderen Mikroorganismen der dentalen Plaque zu konkurrieren [228].

## 2.2.2 Speichel und Pellikel

Da auch der Einfluss von Speichel bzw. der aus ihm gebildeten Pellikel ein Aspekt in der Beurteilung der Biofilmbildung auf den untersuchten Oberflächen war, schließt sich im Folgenden eine Übersicht zur Zusammensetzung und den Aufgaben des Speichels sowie zur Entstehung der Pellikel an.

### 2.2.2.1 Bestandteile und Aufgaben des Speichels

Die Sekretion des menschlichen Speichels erfolgt zum größten Teil [202] über die Glandula parotis, die vor allem Wasser, Elektrolyte und eiweißhaltige Produkte ausscheidet, über die Glandula submandibularis und sublingualis, die dem Sekret einen hohen Anteil an Muzinen verleihen [48] und über die kleinen Speicheldrüsen, wie man sie in der Mundschleimhaut z.B. am Gaumen findet [151]. Einen – bei entzündungsfreien Verhältnissen allerdings sehr geringen – Beitrag liefert auch die Sulkusflüssigkeit [202]. Die komplexe Mischung der einzelnen, in ihrer Zusammensetzung verschiedenen Drüsensekrete wird als Gesamtspeichel bezeichnet [151]. Auch die Zusammensetzung und der pH-Wert des Gesamtspeichels unterliegen Variationen, die tageszeitlich bedingt sowie stimulations- und innervationsabhängig [99] sein können und die Vergleichbarkeit von Studien, bei denen Speichel eingesetzt wird, erschweren. Ausgehend von Untersuchungen zur Speichelzusammensetzung kann man folgende **Bestandteile** aufführen [202]:

- über 99% Wasser
- 0,3% organische, lösliche Stoffe wie Proteine, Amylase, Lysozym, Harnstoff, Laktoferrin, Lipide, sIgA, IgM, IgG
- 0,2% anorganische, lösliche Stoffe wie Kalium, Chlorid, Calcium, Bicarbonat, Phosphat, Natrium, Thiocyanat, Magnesium
- 0,1% unlösliche Stoffe wie desquamierte Epithelzellen, Leukozyten, Speisereste und Bakterien (bis zu 100 Millionen CFU/ml)

Die aufgelisteten Bestandteile sind für die vielen verschiedenen **Aufgaben** des Speichels verantwortlich: Der Gesamtspeichel erfüllt eine Spülfunktion, Amylase und Proteasen dauern die

Nahrung an, durch Bicarbonat, Phosphat und Proteine werden Säuren gepuffert, Fluorid, Phosphat, Calcium und Statherin sorgen für Mineralisation und Remineralisation der Zahnhartsubstanz. Durch Antikörper, Lysozym, Laktoferrin und Laktoperoxidase erhält der Speichel auch eine antibakterielle Aktivität [99]. Während Antikörper – insbesondere sIgA – eine immunologische Barriere darstellen, bilden Agglutinine, das Lysozym-Protease-Anion-System, Laktoferrin/APO-Lakttoferrin, das Laktoperoxidasystem und histidinreiche Polypeptide ein nicht-immunologisches Abwehrsystem [151]:

- Als Vertreter der spezifischen Immunabwehr findet man drei Immunglobuline im Speichel (IgG, IgM, sIgA) [95]: Sekretorisches IgA wirkt vor allem neutralisierend auf mikrobielle Antigene (wodurch die Keime inaktiviert und deren Wachstum auf Zahnoberflächen und Schleimhäuten eingeschränkt werden) und agglutiniert die Mikroorganismen. Seine Wirkung wird allerdings auch durch Proteasen oraler Keime unterdrückt [95, 202]. IgM ist neben der Neutralisation mikrobieller Antigene agglutinierend wirksam, IgG opsoniert Fremdmaterial [95].
- Über Agglutinine, zu denen Muzine, sIgA, Speichelagglutinin, Lysozym,  $\beta_2$ -Mikroglobulin und einige andere Glykoproteine zählen [202], erfolgt die unspezifische Agglutination von Mikroorganismen, insbesondere von Streptokokken und Aktinomyzeten [95]. Sie erschweren durch Zusammenlagerung bzw. das Verklumpen von Mikroorganismen ihre Anheftung auf oralen Geweboberflächen, beschleunigen deren Abtransport (Clearance) und hemmen somit die Kolonisierung von Grenzflächen. Die gebildeten Agglomerate werden verschluckt und durch die Magensäure abgetötet [202].
- Lysozym besitzt eine bakterizide und bakteriostatische Wirkung [202]. Durch Hydrolyse der Peptidoglykanschicht von bakteriellen Zellwänden führt es zu einer gesteigerten Permeabilität der Mikroorganismen, osmotischen Veränderungen und schlussendlich zur Lyse der Bakterien. Weiterhin beruht seine antibakterielle Eigenschaft auf der Aktivierung bakterieller Autolysine [95]. Seine Wirkung erstreckt sich allerdings weniger auf die orale Residentmikroflora [151] als auf neu in die Mundhöhle eingeführte grampositive, lysozym-empfindliche Bakterienstämme, die lysiert und dadurch schon initial an der Kolonisierung oraler Grenzflächen gehindert werden [202]. Die Lysozymresistenz vieler oraler Bakterienstämme kann allerdings durch bestimmte Proteasen überwunden werden [95].
- Laktoferrin wirkt durch Bindung von Eisen, das den Keimen somit nicht mehr als essentielles Spurenelement zur Verfügung steht, primär bakteriostatisch, wird aber *in vivo* durch enzymatische Spaltung und die Diffusionsbarriere in Form von extrazellulären Polysacchariden in seiner Wirkung beeinträchtigt [95, 202].

- Peroxidasen katalysieren die Reduktion von Wasserstoffperoxid und Thiocyanat, wobei Hypothiocyanat entsteht [95], das bakteriostatisch wirkt, indem die mikrobielle Zellwand zerstört und die Kohlenhydrataufnahme und Glykolyse gehemmt wird [202].
- Andere Proteine mit antiinfektiösen Eigenschaften sind Histatin und Cystatine. Cystatine sind auch antiviral wirksam, während Histatin vor allem *Candida*-Spezies in ihrer Funktion beeinträchtigt [95].

Zum nicht-immunologischen Abwehrsystem leisten auch der permanente Speichelfluss und Muzine ihren Beitrag [151].

Muzine sind Glykoproteine, die mit 10 – 25% aller Speichelproteine einen Hauptbestandteil des Speichels darstellen [202]; sie werden in Muzin MG1 und MG2 unterschieden (Näheres zu Muzinen in Kap. 2.2.2.3) und erfüllen nicht nur immunologische Aufgaben: sie sind ein wesentlicher Bestandteil der sogenannten Pellikel [151], die sämtliche oralen Grenzflächen überzieht [202]. Die Bildung der Pellikel ist eine weitere wesentliche Funktion des Speichels [99]. Als physikalisch-chemische Barriere hat sie zwar auch eine Abwehrfunktion, ebenso bietet sie aber Mikroorganismen die Möglichkeit zur Adhäsion [141]. Dies stellt den Ausgangspunkt für die Bildung der Plaque dar, an deren Aufbau eine – trotz des vielfältigen Aufgebots an antimikrobiellen Faktoren – große Zahl an Mikroorganismen beteiligt ist [151].

#### 2.2.2.2 Entstehung der Pellikel

Eine der Aufgaben des Speichels ist die Bildung der Pellikel, die auch als Schmelzoberhäutchen, „acquired pellicle“, „salivary-bacterial pellicle“ [202] oder „pellicula dentis“ [94, 256] bezeichnet wird. Diese aufgrund von transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen als homogene, strukturlose, amorphe und bakterienfreie Membran [94] beschriebene Schicht, deren Dicke in Abhängigkeit von Untersuchungsmethodik, Pellikelbildungszeit und Lokalisation der Pellikel in der Mundhöhle zwischen 80 nm und 2  $\mu\text{m}$  variieren kann [202], entsteht an den Phasengrenzen zwischen Festkörper (Zahnschmelz bzw. zahnärztliche Werkstoffe, Schleimhaut) [25, 45] und Flüssigkeit (Speichel mit darin enthaltenen Proteinen und Biopolymeren) durch selektive **Adsorption spezifischer Speichelproteine** an der Zahnoberfläche [91, 94, 135, 184]. Dieser spontane Adsorptionsprozess kann stattfinden, da er mit einer Zunahme der Gibbs'schen freien Enthalpie  $\Delta G$  ( $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$ ) einhergeht. Im Allgemeinen steigt die Gibbs'sche freie Enthalpie durch eine Abnahme der Reaktionswärme ( $\Delta H$ ) bzw. eine Zunahme der Entropie ( $\Delta S$ ) [18, 91]. Im Fall der Pellikelbildung sind exotherme Reaktionen ( $\Delta H \downarrow$ ), Veränderungen in der Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschicht ( $\Delta S \uparrow$ ), Konformationsänderungen der adsorbierten Proteine ( $\Delta S \uparrow$ ) und die Reduktion der Grenzflächenenergie zwischen fester und flüssiger Phase für die Zunahme der freien Enthalpie verantwortlich [94, 234].

Beim Adsorptionsvorgang der Proteine kommen **verschiedene Arten von Interaktionen** zwischen Festkörper, Flüssigkeit und gelösten Proteinen zum Tragen, die in weit- (50 – 100 nm; Coulomb-, Van-der-Waals-Kräfte), mittel- (10 – 50 nm; hydrophobe Interaktionen) und kurzreichende ( $< 5$  nm; Wasserstoffbrücken, kovalente Bindungen, elektrostatische, ionische und Lewis-Säure-Base-Interaktionen) Kräfte unterschieden werden [91]. Für das Wirksamwerden dieser Kräfte spielen das stark ausgeprägte amphiphile Verhalten der Proteine, das sie aufgrund ihrer polaren und apolaren Gruppen sowie verschiedenartiger Seitenketten aufweisen, und die Polarität der interagierenden Oberflächen, welche sich in ihrer Hydrophilie bzw. Hydrophobie ausdrückt, eine große Rolle [91, 94].

Initial wird die Wechselwirkung zwischen Speichelproteinen und Zahnschmelz über Calciumbrücken und durch elektrostatische Bindungen zwischen den Calciumionen und Phosphatgruppen der Schmelzoberfläche einerseits und entgegengesetzt geladenen Gruppen der Makromoleküle andererseits bestimmt [94, 121]: Da Calciumionen schneller in Lösung gehen als die darunter gelegenen Phosphationen, findet sich an der Schmelzoberfläche eine Schicht von positiv geladenen Calciumionen. Hohe Affinität zu dieser Ionenschicht weisen Phosphoproteine wie Statherin, Histatin und die sog. sauren prolinreichen Proteine auf, die man als Pellikel-Präkursoren (Vorläuferproteine) bezeichnet. Zwischen diesen Proteinen, die als erste an die Schmelzoberfläche binden, und den Phosphationen kommt es zum Ionenaustausch und zur Adsorption der Proteine über Calciumbrücken [91, 95].

Im Laufe des kontinuierlich voranschreitenden Adsorptionsprozesses können zwischen polaren und geladenen Seitenketten der Makromoleküle und Hydroxylgruppen im Phosphat des Zahnschmelzes sowie Wassermolekülen der Hydratationsschicht Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Wenn Speichelproteine bereits durch elektrostatische Kräfte wie Wasserstoffbrücken an der Schmelzoberfläche festgehalten werden, tragen auch Van-der-Waals-Kräfte sowie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen nonpolaren Seitenketten freier und bereits adsorbierter Makromoleküle zur Konsolidierung der Pellikel bei [91, 94], so zum Beispiel bei der Adsorption von Muzinen, Amylase, Cystatinen, Lysozym, Carboanhydrasen, Laktoferrin und bakteriellen Glycosyltransferasen [95]. Grundsätzlich führen diese Adsorptionsprozesse zu einem Gewinn an Entropie durch Substitution von Wassermolekülen an der Oberfläche des Schmelzes bzw. zu einer Reduktion der freien Oberflächenenergie [91, 95].

Spontan und innerhalb weniger Sekunden [91, 95] kommt es durch die genannten Interaktionen zur Adsorption folgender **Bestandteile**, die sich zunächst zu einer Basalpellikel formieren [95]:

- Mizellen aus sauren prolinreichen Proteinen (unilamellare Vesikel) adsorbieren an die Zahnoberfläche. Die amphiphilen Moleküle bilden eine Doppelschicht.
- Heterotype Komplexe aus Amylase, sauren prolinreichen Proteinen, sIgA, Muzin MG1,

Lysozym, Amylase, Cystatin und Statherin adsorbieren an die Zahnoberflächen, wobei diese Moleküle ihre Konformation verändern. Die dabei erfolgende Entfaltung und Abflachung der Proteine führt zu einer schnellen Bedeckung der zugrundeliegenden Oberfläche [91].

- Auch einzelne Moleküle der frei im Speichel vorhandenen Proteinfractionen adsorbieren an den Schmelz.

Im Speichel konnten **heterotype Komplexe** detektiert werden, die aus Muzin MG1 und daran nicht kovalent gebundenen Proteinen wie Amylase, Lysozym, sauren prolinreichen Proteinen, Cystatin und Statherin bestehen. Man vermutet daher, dass vor allem Proteinagglomerate in Gestalt der heterotypen Komplexe bzw. der mizellartigen Strukturen und nicht einzelne Proteine für die Pellikelbildung von Bedeutung sind. Diese Proteinaggregate, die auch als supramolekulare Pellikel-Präkursoren bezeichnet werden, dienen als Reservoir für Pellikelproteine, schützen diese vor proteolytischer Umsetzung durch Speichelproteasen und verfügen vermutlich über eine negativ geladene Außenhülle und einen hydrophoben Kern [91, 95, 241]. Die negative Ladung führt zur Ansammlung von Ionen in Form einer elektrischen Doppelschicht, wodurch die Proteine ein Oberflächenpotenzial und Eigenschaften kolloidaler Teilchen erhalten [91] (vgl. Kap. 2.2.3.1). Die Entfaltung eines globulären Proteins während des Adsorptionsprozesses setzt den hydrophoben Kern des Moleküls frei. Hydrophobe Gruppen aus dem Proteininneren werden zur adsorbierenden Oberfläche orientiert, die hydrophilen Bereiche des Proteinmoleküls ragen hingegen in das wässrige Milieu. Dabei werden die hydrophoben Regionen der Proteine durch die Reaktion mit der Substratoberfläche vor der Interferenz mit Wassermolekülen abgeschirmt. Im Gegensatz zu den leichter reversiblen, hydrophilen Interaktionen zwischen Proteinen und adsorbierenden Oberflächen stellen hydrophobe Wechselwirkungen relativ feste, irreversible chemische Bindungen dar [50, 94].

In einem mehrstündigen **Reifungsprozess** im Sinne einer Remodellation, der neben kontinuierlichen Desorptionsprozessen und Proteolyse auch die Adsorption einzelner Speichelproteine sowie die Anlagerung weiterer heterotyper Komplexe an die Basalpellikel umfasst, setzt sich die Pellikelbildung fort [94, 95]. Es kommt zur Änderung der Proteinzusammensetzung und -konformation in den adsorbierten Biopolymerschichten, z.B. reduziert sich der anfängliche Gehalt an sauren prolinreichen Proteinen von 37% auf 0,1% [17]. Die Ultrastruktur verändert sich dadurch insofern, als dass der dünne, wenige Nanometer dicke [95], unebene und inkomplette Film ein kompaktes und elektronendichtes ultrastrukturelles Erscheinungsbild erhält [141]. Auch im elektronenmikroskopischen Bild spiegeln sich die zwei Phasen [91] der Pellikelbildung wider: eine basale, dem Schmelz direkt aufliegende, elektronendichte Schicht, die von einer äußeren globulären Schicht geringerer Elektronendichte überkleidet ist [95].

### 2.2.2.3 Bedeutung der Pellikel

Da der Adsorptionsprozess spezifisch und selektiv verläuft, sind nicht alle Komponenten oraler Flüssigkeiten in die Pellikel integriert [91, 95]. So weicht die Pellikelkomposition hinsichtlich Enzymaktivitäten und Lipidgehalt (der in der Pellikel deutlich höher ist) von der Zusammensetzung des Speichels ab [95]. Bevorzugt adsorbieren Proteine mit hoher Affinität zu Hydroxylapatit wie z.B. saure prolinreiche Glykoproteine, die ein obligater Bestandteil der Pellikel sind [94, 135]. Sie stellen gemeinsam mit Statherinen und Muzinen die Hauptkomponenten der Pellikel dar. Nebenkomponten sind Agglutinin, Albumin, sIgA, IgG,  $\alpha$ -Amylase, Laktoferrin, Lysozym,  $\beta_2$ -Mikroglobulin, Fibronectin, Glycosyltransferasen, Cystatine und Histidine, womit es sich um Bestandteile aus Speichel, Sulkusflüssigkeit, Mukosa und Bakterien handelt [202]. Mit den Eigenschaften dieser Hauptbestandteile lassen sich sowohl die **protektiven** Eigenschaften der Pellikel wie die Verringerung der Friktion antagonistischer Zahngruppen bei Abrasions- und Attritionsprozessen, Schutz vor Demineralisation und Reduktion der Schmelzlöslichkeit [94] durch verminderte Calcium-, Phosphat- und  $H^+$ -Diffusion [95] als auch ihre **pathologischen** Eigenschaften erklären. Die unerwünschte Wirkung der Pellikel besteht darin, dass sie Rezeptorproteine für mikrobielle Zellwandbestandteile bereitstellt, wodurch die Adhäsion von Mikroorganismen ermöglicht wird [91, 202, 202]. Die im Folgenden beschriebenen Hauptbestandteile der Pellikel stellen Strukturen dar, die u.a. die bakterielle Adhäsion vermitteln; andere Pellikelkomponenten und die bakteriellen Strukturen, die ebenfalls für die Bindung der Keime an die Pellikel erforderlich sind, werden hier nur erwähnt; ihre genaue Beschreibung und die Darstellung der Bakterienadhäsion folgt in Kapitel 2.2.3.1 (zu den Nebenkomponten der Pellikel siehe Kap. 2.2.2.1):

- Muzine: Muzine sind Glykoproteine mit hohem Molekulargewicht, die über 40% Kohlenhydrate enthalten und in die chemisch verschiedenartig aufgebauten Muzinglykoproteine 1 (MG1) und 2 (MG2) unterschieden werden. Prinzipiell bestehen sie aus einem Proteingrundgerüst, das Oligosaccharidseitenketten von unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung enthält [151]; einige dieser Seitenketten sind verzweigt und tragen als endständige Moleküle oft Fucose, Sialinsäure oder auch Sulfatgruppen (Sulfomuzine) und manchmal auch Blutgruppenantigene [202]. Während MG1 der Pellikel durch seinen hohen Kohlenhydratanteil von bis zu 90% ihrer **Undurchlässigkeit** verleiht und Wasser bindet [202], wobei durch Interaktionen mit Phospholipiden die Festigkeit der Pellikel gesteigert wird [95], bindet MG2 eine große Anzahl von Mikroorganismen, insbesondere dann, wenn es mit sIgA komplexiert ist. Durch die Agglutination oraler Bakterien (darunter auch Streptokokken und *Actinomyces* spp.) werden die Bakterien einerseits eliminiert, andererseits aber die Bildung von **Biofilmen gefördert**. Letzteres geschieht unter anderem auch da-

durch, dass Sulfatgruppen und Blutgruppenantigene der Kohlenhydratketten als Liganden für bakterielle Lektine dienen [202]. An der Bindung zwischen Muzinen und Bakterien scheint außerdem Neuraminsäure beteiligt zu sein. Weiterhin stellen Muzine auch Kohlenhydrate (die im Speichel nur in niedriger Konzentration vorliegen und durch Glykosidasen freigesetzt werden) und Proteine als Nährstoffe für Keime zur Verfügung [151].

- Saure prolinreiche Glykoproteine (PRPs): Durch die Bindung an Calciumionen, Hydroxylapatit und andere Speichelproteine initiieren die PRPs die Pellikelbildung und ermöglichen dadurch anderen Speichelkomponenten erst die Anhaftung an die Zahnoberflächen [202]. Die antibakterielle Wirkung der PRPs beruht darauf, dass sie zur **Aggregation oraler Keime** (und damit deren Eliminierung aus der Mundhöhle) führen und an frei in der Mundhöhle befindliche Bakterien binden. Weiterhin besetzen PRPs mikrobielle Bindungsstellen, die für die Kolonisierung der Zahnhartsubstanz benötigt werden. Diese Wechselwirkung zwischen PRPs und Mikroorganismen kommt durch die Bindung an bakterielle Adhäsine und Fimbrien zustande, die aber auch für eine andere Funktion der PRPs verantwortlich ist: die **Adhäsion von Pionierkeimen**, zu denen auch *Actinomyces naeslundii* und *Streptococcus gordonii* zählen. Bakterien haften dann an Zahnhartsubstanzen, wenn Pellikelproteine (vor allem PRPs und die nachfolgend beschriebenen Statherine) auf einer festen Oberfläche adsorbieren, denn dabei werden durch Konformationsänderungen sogenannte Kryptitope frei. Es handelt sich dabei um Molekülabschnitte, die verborgen bleiben, solange das Protein in gelöster Form vorliegt [77,94,95]. Sie dienen als Bindungsstellen für bakterielle Adhäsine (siehe Kap. 2.2.3.1), wobei insbesondere PRP-Kryptitope eine Reihe verschiedener Bakterien binden [95,202].
- Statherin: Der protektive Einfluss dieses sauren Phosphoproteins [201] besteht vor allem darin, dass es den Mineralhaushalt reguliert und die **Calciumpräzipitation inhibiert** [95]. Desweiteren zeigt seine Anwesenheit in der Mundhöhle ähnliche Folgen wie die der PRPs: durch die starke Bindung an Hydroxylapatit initiieren sie zum einen die Pellikelbildung, zum anderen werden dabei Kryptitope für bakterielle Adhäsionsmoleküle freigelegt und somit die Kolonisierung und **Plaquebildung eingeleitet** [202]. Dabei wird nicht nur die Bindung von Erstbesiedlern (v.a. von *Actinomyces naeslundii*) ermöglicht, das über Typ-1-Fimbrien an PRPs und an Statherine binden kann [38,89], sondern auch von Nachfolgerkeimen und pathogenen Spezies (*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*). Vor allem die Bindung an *Fusobacterium nucleatum* ist von entscheidender Bedeutung für die Reifung eines Biofilms [202] (siehe Kap. 2.2.3.2).

Die Pellikel kann insgesamt als Mediator zwischen Speichel, Plaque und Zahn [95] und als **Wegbereiter für die orale Biofilmbildung** [202] bezeichnet werden – zum einen aufgrund

der bakterienbindenden Eigenschaften ihrer Hauptbestandteile [95], zum anderen deshalb, weil die Speichelproteine, aus denen die Pellikel besteht, meist schneller an die oralen Oberflächen diffundieren als die anwesenden Bakterien und deren Kontakt zur Oberfläche somit meist über die Pellikel erfolgen muss und nicht an unmodifizierten Oberflächen stattfinden kann [93,94].

Desweiteren **unterliegen alle oralen Oberflächen**, also nicht nur die Zahnhartsubstanzen, sondern auch mukosale Epithelien, Plaquebiofilme, Implantate und zahnärztliche Restaurationsmaterialien [202] einer **Beschichtung durch die Pellikel**, was ihre universelle Bedeutung zeigt. Da an (restaurierten) Zahnoberflächen keine Abschilferung oder Regeneration stattfindet und somit ein natürlicher Abwehrmechanismus, wie man ihn an Epithelien findet, fehlt, können sich auf diesen ungeschützten Oberflächen – vermittelt durch die Pellikel – große Plaquemengen ansammeln. Dem initialen oralen Biofilm kommt also auch eine besondere pathophysiologische Bedeutung bei der Entstehung von Karies, Erosionen und Parodontopathien zu [95,99,151,231].

Aufgrund einer **adhäsionsselektiven Wirkung** bei der Vermittlung der bakteriellen Anhaftung soll die Pellikel auch Einfluss auf die spätere Zusammensetzung der Plaque nehmen können [99]. Diese Wirkung beruht zum einen darauf, dass durch Enzyme aus Speichel, Sulkusflüssigkeit, Biofilmbakterien, desquamierten Epithelzellen und Leukozyten die Pellikel so modifiziert wird, dass für bestimmte Bakterien Rezeptorproteine abgebaut und somit ihre Ansiedlung erschwert wird, für andere Bakterien hingegen neue Liganden entstehen [94,195,202] (siehe Kap. 2.2.3.1). Zum anderen wird der Vorgang der Anlagerung und auch die Abfolge der adhären- den Keime wesentlich durch die Anwesenheit und chemische Zusammensetzung der Pellikel, die lokal und interindividuell starke Unterschiede aufweisen kann, bestimmt [151,202]: So wurde gezeigt, dass die Bakterienspezies *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus sobrinus* in höherem Umfang an nicht speichelbedecktes Hydroxylapatit adhären [75,144], während die Adhäsion von *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* und *Actinomyces viscosus* an Hydroxylapatitoberflächen in Anwesenheit einer Pellikel erhöht [94] ist, wobei dies im Fall von *Streptococcus mutans* auf der Präadsorption von PRPs oder hochmolekularen Muzinen beruht [75]. Untersuchungen zur Adhäsion von *Streptococcus gordonii* und *Actinomyces naeslundii* an Glas ergaben, dass die Adhäsion dieser beiden Keime durch die Konditionierung mit Speichel ebenfalls erhöht ist, wobei durch die Anwesenheit von Speichel bei *Streptococcus gordonii* Gene hochreguliert werden, die für ein Oberflächenprotein codieren, das an der Bindung an Speichelbestandteile beteiligt ist [176]. Weiterhin wurde festgestellt, dass PRPs und Statherin innerhalb der Pellikel auf dem Schmelz die Adhäsion von *Actinomyces naeslundii*, einigen Stämmen von *Streptococcus mutans* und von einigen Anaerobiern fördern [151]. PRPs wirken durch ihre Kryptitope in besonderem Ausmaß fördernd auf die bakterielle Anhaftung an der Schmelzoberfläche, indem sie als Brücke zwischen den Hydroxylapatitkristallen und den Bakterien fungieren [77].



### 2.2.3 Vom initialen Biofilm zur Plaque

In Kapitel 2.2.1 wurden bereits die Adhäsion oraler Keime an (pellikelbedeckte) Oberflächen und ihre Interaktion in bestehender Plaque angesprochen. In den folgenden Kapiteln sollen die dabei stattfindenden Vorgänge näher beschrieben werden.

#### 2.2.3.1 Interaktion von Bakterien und (pellikelbedeckten) Grenzflächen

Auch Mikroorganismen können wie Speichelproteine direkt an orale Grenzflächen binden [93]. Da die Proteine über Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen allerdings rascher mit der Oberfläche interagieren können als die Mikroorganismen, deren Adhäsion spezifischer verläuft und vor allem von Fimbrien vermittelt wird, zeigen sich Proteine und Glykoproteine bei der initialen Biofilmbildung gegenüber den Bakterien als überlegen [95]. Bei der im vorigen Kapitel beschriebenen Pellikel handelt es sich also um eine noch nahezu bakterienfreie Schicht aus adsorbierten Proteinen, Glykoproteinen und anderen Makromolekülen wie z.B. Enzymen aus dem umgebenden Speichel [91,93,95]. Die Entwicklung dieses initialen oralen Biofilms zur dentalen Plaque, die einen bakteriellen, dreidimensionalen, strukturierten Biofilm mit extrazellulärer Matrix als typischem Bestandteil [95] darstellt, erfolgt erst sekundär. Mikroorganismen interagieren somit meist nicht unmittelbar mit einer „reinen“ oralen Oberfläche, sondern mit einer pellikelbedeckten Oberfläche. Unabhängig von der Anwesenheit einer Pellikel ist die Voraussetzung für die bakterielle Akkumulation und Proliferation die Fähigkeit oraler Mikroorganismen, unter den hydrodynamischen Bedingungen des oralen Milieus an Oberflächen irreversibel zu adhären [78,94,166].

**Interaktionen und Kräfte:** Die Anhaftung von Mikroorganismen kann nicht mit einer einzelnen Form von Interaktion erklärt werden, sondern nur durch das Zusammenwirken verschiedener **Faktoren** und **Kräfte** [231]: Sobald sich ein Bakterium einer Oberfläche nähert, laufen zwischen dem Substrat und der Zelle **spezifische** und **unspezifische Wechselwirkungen** ab, die bestimmen, ob Adhäsion und Kolonisierung stattfinden [151]. Die spezifischen Interaktionen beruhen auf der Bindung von bakteriellen Adhäsinen an Wirtsrezeptoren [151]. Zu den unspezifischen Wechselwirkungen zählen einerseits Mechanismen wie hydrophobe Interaktionen, Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoff- und Calciumbrücken, die die Bakterien an einer Oberfläche binden, und andererseits solche, die die Bakterien von Oberflächen entfernen, z.B. Speichelfluss und elektrostatische Interaktionen [91,202]. Das Auftreten und die Auswirkung dieser Wechselwirkungen ist von der **Gibb'schen freien Enthalpie** der Grenzflächen, der **freien Oberflächenenergie** der Bakterien und Festkörper, der **Rauigkeit** und den **chemischen Eigenschaften** der Festkörperoberflächen sowie von der **Ionenstärke** des Speichels und dem Abstand zwischen Bakterium und Oberfläche abhängig [21,91,164].

**Phasen des Adhäsionsprozesses:** Den Adhäsionsprozess kann man in **verschiedene Phasen** (Transport der Bakterien an die Oberfläche – initiale Adhäsion – feste Anhaftung durch spezifische Interaktionen – Besiedelung) einteilen und folgendermaßen beschreiben [20, 94, 151, 202]: In einem ersten Schritt lagern sich Pionierkeime, nachdem sie entweder passiv durch Speichelfluss, Brown'sche Molekularbewegung und Sedimentation oder aktiv durch bakterielle Fortbewegung [119, 231] an die mit der Pellikel überzogene Zahnoberfläche transportiert worden sind [132, 151], zunächst **reversibel** im Bereich von Oberflächenrauigkeiten an die Zahnoberfläche an [21, 91, 95]. Bei dieser unspezifischen Annäherung treten über Lang- und Kurzstrecken wirksame [91] (siehe Kap. 2.2.2.2), schwache, physikochemische Wechselwirkungen zwischen der Zelloberfläche des Mikroorganismus und dem mit der Pellikel überzogenen Zahn auf und fixieren die Bakterien nur locker. Obgleich sowohl die Mikroorganismen durch die Moleküle auf ihrer Zelloberfläche als auch die sauren Proteine, die in der erworbenen Pellikel vorhanden sind, eine negative Ladung besitzen [151], kann eine thermodynamisch günstige Situation bzw. durch das Zusammenspiel von Van-der-Waals-Kräften, Lewis-Säure-Base-Bindung und elektrostatischer Abstoßung [29] ein Bereich mit schwacher Nettoanziehung entstehen, die eine reversible Anheftung ermöglicht [151]. Das Auftreten dieser Anziehung kann mit dem thermodynamischen Modell bzw. mit Hilfe der (erweiterten) DLVO-Theorie (benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek) erklärt werden [29, 231]:

Thermodynamisches Modell: Diese Theorie verwendet zur Erklärung der mikrobiellen Adhäsion die Oberflächenenergie (von Festkörpern: hier Bakterien, Substrat) bzw. die Oberflächenspannung (von Flüssigkeiten: hier Speichel) der wechselwirkenden Oberflächen [3, 94, 199].

Zunächst befindet sich zwischen Bakterium und Festkörper ein Wasserfilm und somit zwei Grenzflächen – Bakterium-Flüssigkeit (BFl) und Festkörper-Flüssigkeit (FFl). Für jede Grenzfläche kann eine Gibbs'sche Enthalpie  $G$  berechnet werden [199]. Wenn eine Bindung des Bakteriums an den Festkörper zustande kommen soll, muss dazu der Wasserfilm entfernt werden; damit entsteht eine neue Grenzfläche Bakterium-Festkörper (BF), wodurch es auch zu einer Änderung der Gibbs'schen freien Enthalpie  $\Delta G_{Adh}$  kommt, die sich mit  $G_{BF} - G_{FFl} - G_{BFl}$  berechnen lässt. Die Entfernung des Wasserfilms und die Bildung der neuen Grenzfläche tritt nur auf, wenn die Änderung der Gibbs'schen freien Enthalpie  $\Delta G_{Adh} = G_{BF} - G_{FFl} - G_{BFl}$  durch die Bindung einen negativen Wert annimmt, die freie Enthalpie also sinkt, da ein natürliches Bestreben nach minimaler freier Enthalpie besteht [91, 231].

Man kann die freie Enthalpie der Adhäsion auch als Summe ihrer beiden Komponenten  $G_{Adh}^{AB}$  und  $G_{Adh}^{VW}$  darstellen, wobei  $G_{Adh}^{VW}$  die Van-der-Waals- und  $G_{Adh}^{AB}$  die Säure-Base-Komponente bezeichnet [240]. Die Van-der-Waals-Komponente  $G_{Adh}^{VW}$  ist eine apolare elektrodynamische Kraft, die sich aus Dipol-Dipol-Interaktionen zwischen permanenten Dipolen (Keesom), zwischen einem permanenten und einem induzierten Dipol (Debye) sowie zwischen einem fluktuierenden

und einem induzierten Dipol (London) zusammensetzt und mit zunehmender Distanz zwischen den Dipolen schnell an Stärke verliert [237]. Der Säure-Base-Komponente liegen polare Kräfte zugrunde, die auch  $A_{cid}B_{ase}$ -Kräfte genannt werden (im Sinn des Säure-Base-Begriffs nach Lewis) und auf Elektronenakzeptor-Elektronendonator-Interaktionen zwischen polaren funktionellen Gruppen in einem polaren Medium beruhen [26,237]. Ein Beispiel für eine derartige polare Kraft sind Wasserstoffbrückenbindungen. Im Gegensatz zu Van-der-Waals-Kräften, die so gut wie immer anziehend wirken [237], können polare Kräfte attraktiv und repulsiv sein [91]. Beim Vorliegen attraktiver polarer Kräfte wird oft der Begriff „hydrophobe Wechselwirkung“ verwendet, im entgegengesetzten Fall wird von „Hydrationsdruck“ gesprochen [26, 237]: Die polaren Kräfte sind für die Orientierung der Wassermoleküle an einer Oberfläche verantwortlich. Wenn die Wassermoleküle auf zwei Partikeln oder Oberflächen gleich orientiert sind, kommt es zur Abstoßung. Allerdings spielt hierbei auch die Polarität der Oberfläche eine Rolle, denn von ihr hängt die Stärke, mit der die Wassermoleküle orientiert sind, ab. Stark monopolare AB-Kräfte innerhalb der Hydrathülle fixieren die Wassermoleküle in ihrer Ausrichtung und verhindern so eine Annäherung des Partikels an eine Oberfläche über AB-Kräfte zwischen den Hydrathüllen [91,237]. Schwach monopolare AB-Kräfte lassen im Gegensatz einen Kontakt zwischen Partikeln zu, weil sie eine Umorientierung der Wassermoleküle innerhalb der Hydrathülle zulassen. Die an sich über Kurzstrecken wirkenden polaren Kräfte üben also über die Ausrichtung von Wassermolekülen hydrophobe- und Hydratisierungseffekte (häufig mit dem Begriff „Hydrophobizität“ zusammengefasst) [26] und über diese wiederum mittel- und weitreichenden Einfluss auf andere Partikel aus [237]. Da die „Hydrophobizität“ eines Bakteriums in direktem Zusammenhang mit der freien Energie bzw. der Grenzflächenspannung zwischen den Organismen und dem sie umgebenden wässrigen Medium steht, erklärt sich, dass die Säure-Base-Komponente  $G_{Adh}^{AB}$  einen Teil der Gibb’schen freien Enthalpie  $\Delta G_{Adh}$  darstellt. Nach der Theorie von van Oss sind danach solche Verbindungen hydrophob, für die  $\Delta G_{Adh} < 0$  gilt [152]. Beim thermodynamischen Modell werden also vor allem polare Kräfte und Van-der-Waals-Kräfte zur Erklärung der Bakterienadhäsion berücksichtigt. Die Bedeutung elektrostatischer Wechselwirkungen und des Abstandes der interagierenden Oberflächen wird nicht erfasst [199,240].

DLVO-Theorie: Im Gegensatz zum thermodynamischen Modell bezieht diese Theorie, die sich mit der Stabilität kolloidaler Systeme unter dem Einfluss attraktiver und repulsiver Kräfte zwischen den dispergierten Teilchen beschäftigt [137], Van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen sowie deren Abhängigkeit von der Ionenstärke der Lösung und dem Abstand der interagierenden Oberflächen ein [22]. Van-der-Waals-Kräfte  $G^{VW}$  wirken unabhängig von der Ionenstärke bei geringen Abständen anziehend. Elektrostatische Wechselwirkungen  $G^{EL}$  sind weitreichende Kräfte, die zwischen gleich geladenen Oberflächen auftreten und entsprechend dem Coulomb’schen Gesetz abstoßend wirken. Sie sind stark von der Ionenstärke der

umgebenden Lösung abhängig [199], was man folgendermaßen erklären kann: Partikel bzw. Bakterien in wässriger Suspension und Oberflächen in Kontakt mit wässrigen Lösungen können eine Oberflächenladung erhalten, z.B. durch die bevorzugte Adsorption von bestimmten Ionen aus der Lösung oder durch Ionisation bestimmter Gruppen, die an dem Partikel oder an der Oberfläche angeheftet sind [151]. Aufgrund dieser Oberflächenladung erfolgt in der direkt umgebenden Lösung der Oberfläche ein Ionentransport, der eine Anlagerung von Gegenionen und Verdrängung gleichartiger Ionen bewirkt, was zu einem Ausgleich der Oberflächenladung und zur Bildung einer diffusen elektrischen Doppelschicht (zum ersten Mal 1942 von Stern beschrieben) um die Oberflächen führt [91, 151, 199, 231]. Mit Zunahme der Ionenstärke ( $I$ ) der Lösung wird die elektrische Doppelschicht komprimiert und reicht nicht soweit in die Lösung hinein, wird also dünner [199]. Da es erst dann zu einer elektrostatischen Interaktion kommt, wenn sich die elektrischen Doppelschichten zweier Oberflächen überlappen [231], kommt es bei größerer Ionenstärke folglich zur Abnahme elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den interagierenden Oberflächen (in Abhängigkeit des Abstandes (Distanz  $D$ )) [199].

Die Gibb'sche freie Energie der Wechselwirkung  $G_{tot}$  kann man darstellen, indem man die Summe der bei der Überlappung der Doppelschichten auftretenden Kräfte  $G^{VW}$  (anziehend) und  $G^{EL}$  (abstoßend) als Funktion des Abstandes der interagierenden Flächen aufträgt. Sie ist abhängig von Abstand  $D$  und Ionenstärke  $I$  (siehe Abb. 2.1) [91, 199, 231].

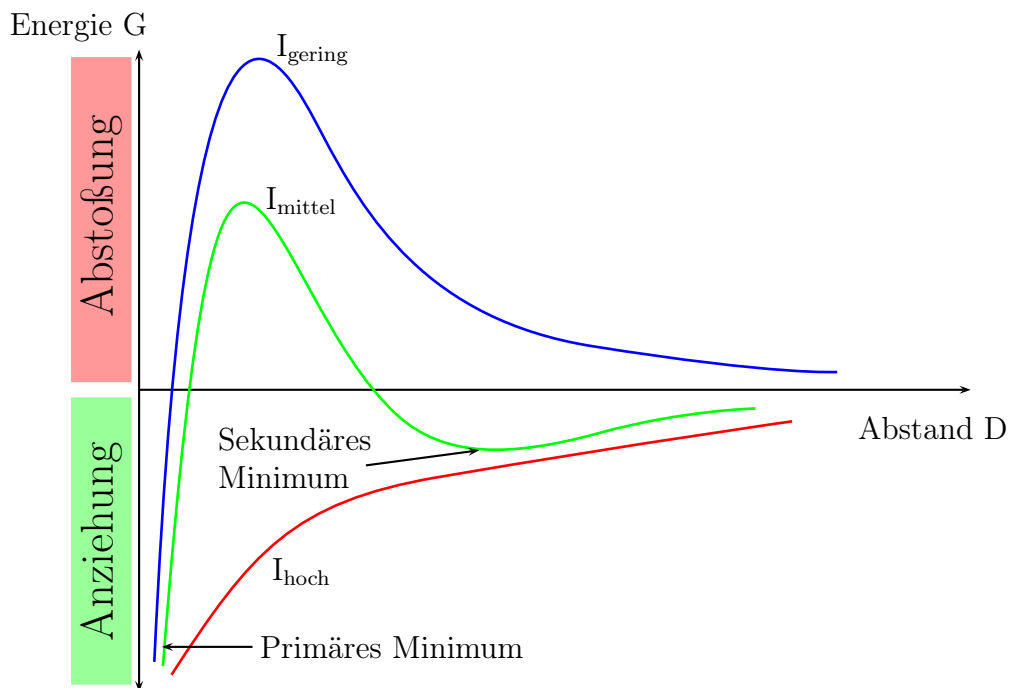


Abbildung 2.1: DLVO-Theorie (Abbildung modifiziert nach [119, 199, 235])

Man erkennt, dass ein Partikel bzw. ein Bakterium bei mittlerer Ionenstärke während der Annäherung an eine Oberfläche eine schwache Van-der-Waals-Anziehung erfährt, die durch die fluktuierenden Dipole innerhalb der Moleküle auf den beiden sich annähernden Oberflächen hervorgerufen wird. Die Anziehung nimmt zu, wenn sich das Partikel/Bakterium näher in Richtung Substrat bewegt (sekundäres Minimum) [151]. Für die meisten Bakterien besitzt die gesamte Energie  $G_{tot}$  bei einem Abstand von 5 – 20 nm ein solches sekundäres Minimum, in welchem die Bakterien reversibel fixiert sind. Falls sich jedoch die Oberflächen noch weiter aufeinander zubewegen, treffen sie aufgrund der Überlappung der elektrischen Doppelschichten auf eine abstoßende Kraft – ein positives Maximum der gesamten Energie  $G_{tot}$ , bei dem die Bakterienadhäsion behindert wird. Bei noch stärkerer Annäherung auf weniger als 2 nm zeigt  $G_{tot}$  ein starkes primäres Minimum, bei dem eine irreversible Bindung möglich ist. Im Gegensatz dazu erreicht das sekundäre Minimum nur selten stark negative Werte, so dass die Bindung der Bakterien relativ schwach ist und leicht gelöst werden kann, beispielsweise durch Eigenbewegung oder durch Abscherkräfte [21, 94, 151, 151, 231]. Eine hohe bzw. niedrige Ionenstärke führt zu einem anderen Kurvenverlauf, was daran liegt, dass der Einfluss der abstoßenden Kraft  $G^{EL}$  mit zunehmender Ionenstärke sinkt bzw. mit abnehmender Ionenstärke steigt und somit bei hoher Ionenstärke nur noch die anziehende Kraft  $G^{VW}$  wirkt bzw. bei geringer Ionenstärke auch abstoßende Kräfte zum Tragen kommen [22].

Erweiterte DLVO-Theorie: Beide Modelle können die mikrobielle Adhäsion nur zu einem Teil erklären. Vor allem, wenn es um die Adhäsion in wässrigen, polaren Systemen wie z.B. der Mundhöhle geht, bestehen – besonders bei Anwendung der DLVO-Theorie und geringen Abständen der wechselwirkenden Oberflächen – oft große Diskrepanzen zwischen der theoretisch vorausgesagten und experimentell tatsächlich beobachteten Partikelstabilität und -adhäsion [26, 107, 231, 236]. So stoßen beispielsweise viele Biopolymere, Partikel und Zellen ihr gleichartiges Gegenüber ab, obwohl man dies aufgrund der geringen Oberflächenladung und somit im Vergleich zu den anziehenden Van-der-Waals-Kräften geringen elektrostatischen Kräften nicht erwarten würde. Aus diesem Grund wurde von Van Oss *et al.* 1986 die sogenannte erweiterte DLVO-Theorie vorgestellt [231]. Mit dieser können bei der Vorhersage der bakteriellen Adhäsion präzisere Angaben gemacht werden als mit der klassischen DLVO-Theorie [26, 231], da Van-der-Waals-, elektrostatische und polare Kräfte berücksichtigt [26, 91, 107, 199, 231, 237, 240] und damit Aspekte beider Modelle miteinander vereint werden [91, 199]:  $\Delta G = \Delta G^{AB} + \Delta G^{VW} + \Delta G^{EL}$  [237]. Alle drei Größen nehmen mit zunehmendem Abstand zwischen den Teilchen ab; verglichen mit Van-der-Waals-Kräften und elektrostatischen Wechselwirkungen haben polare Wechselwirkungen aber den größten Einfluss [91, 231], sind um bis zu zwei Größenordnungen stärker [26] und machen in Wasser circa 90% aller nicht-kovalenten Wechselwirkungen aus [91, 236]. Somit wird erklärbar, dass Organismen schon bei einem Trennungsabstand von 10 – 20 nm irreversibel in

einem an und für sich schwachen Sekundärminimum festgehalten werden können, denn zusätzlich zu den Van-der-Waals-Kräften setzen auch polare Interaktionen im Sinn von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Proteinen der Pellikel und der bakteriellen Oberfläche ein, die bei einer Annäherung auf 10 nm bis zu 100-mal stärker sind als die Van-der-Waals-Kräfte [94]. Durch den dehydratisierenden Effekt der Zellhydrophobizität und der hydrophoben Bestandteile von Zelloberflächen auf den Wasserfilm zwischen den interagierenden Oberflächen wird dieser Wasserfilm letztlich entfernt [151]. Die Freisetzung von Detergenzien durch bestimmte Bakterien trägt dazu ebenso bei [202]. Zwischen dem Grad der Hydrophobizität der Zelloberflächen und der Anheftung von oralen Keimen an speichelüberzogene Oberflächen besteht ein direkter Zusammenhang, denn durch die Entfernung des Wasserfilms können sich die Oberflächen bis auf 0,5 nm [109] annähern, so dass über Kurzstrecken wirksame Wechselwirkungen stattfinden können [151, 231].

Diese Wechselwirkungen, zu denen neben kovalenten chemischen Bindungen, Calciumbrücken, Ionenpaarbindungen, Dipol-Dipol-Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen [94, 202, 231] vor allem spezifische stereochemische Wechselwirkungen zwischen Adhäsinen auf der mikrobiellen Zelloberfläche und Rezeptoren in der erworbenen Pellikel gehören, ermöglichen die zweite Phase der Interaktion zwischen Bakterien und oralen Oberflächen: Es kommt zur **irreversiblen Anheftung** [21, 91, 95, 151, 202, 231].

Die (irreversible) Bindung durch spezifische extrazelluläre Proteinkomponenten (Adhäsine) auf den Organismen und komplementäre Rezeptoren (Glykoproteine, Polysaccharide) in der Pellikel ist Spezies-spezifisch. Bei diesen „spezifischen“ Interaktionen handelt es sich allerdings genaugenommen auch um unspezifische Wechselwirkungen, die allerdings in räumlich sehr begrenzten Abschnitten der Oberflächen und über eine sehr geringe Distanz von weniger als 5 nm stattfinden [231].

**Bakterielle Adhäsine:** Die Adhäsine, die an der irreversiblen Bindung der Mikroorganismen einen wesentlichen Anteil haben, sind vor allem Oberflächenproteine [202], Lektine, Lipoteichonsäuren, Lipoproteine oder Polysaccharidschichten an der Bakterienoberfläche [95].

**Lektine** sind kohlenhydratbindende Proteine, die stereochemisch mit bestimmten Pellikelproteinen (z.B. PRPs), extrazellulären Polysacchariden in der Plaque (Dextrane) oder Oligosacchariden in Glykoproteinen, die an Zelloberflächen adsorbiert sind, reagieren können [151, 202]. Oft sind Lektine mit Oberflächenstrukturen assoziiert, die als Fibrillen oder Fimbrien bezeichnet werden. Fibrillen können von Fimbrien dadurch unterschieden werden, dass sie miteinander verklumpen und keine messbare Breite haben, Fimbrien hingegen besitzen eine messbare Breite (3 – 14 nm) und eine variable Länge bis zu 20 µm. Einige Zellen besitzen sowohl Fibrillen als auch Fimbrien, manchmal sogar verschiedene Arten davon [151, 202]. Eine zusätzliche Funktion der bakteriellen Lektine besteht wahrscheinlich in der Bindung von Speichelglykoproteinen an

der Zelloberfläche. Die Kohlenhydratseitenketten der Glykoproteine werden durch bakterielle Glukosidasen aufgebrochen und die freigesetzten Kohlenhydrate nach dem Transport in das Zellinnere für bakterielle Syntheseleistung genutzt [94].

**Lipoteichonsäure** besteht aus Glycerin- oder Ribitolmolekülen, die über Phosphatbrücken miteinander verestert sind, und ist Bestandteil vieler grampositiver oraler Keime. Lipoteichonsäuren interagieren auch mit blutgruppenspezifischen Substanzen in der Pellikel [151].

**Lipoproteine** sind Adhäsine, an deren einem Ende sich ein Lipid befindet, mit dessen Hilfe sie in der Zellmembran verankert sind. Diese Lipoproteine können an eine immobilisierte Substanz (ein adsorbiertes Zucker- oder Peptidmolekül) in der erworbenen Pellikel oder auf der Zelloberfläche eines anderen Bakteriums binden und so die Anhaftung erleichtern [151].

Zu den bedeutenden Adhäsinen gehört die Antigen-I/II Familie der **Polypeptide**, die in der Zelloberfläche verankert sind und bei den meisten oralen Streptokokken vorkommen. Diese linearen Polypeptide haben komplexe Strukturen, sind multifunktionelle Adhäsine und haben mehrere verschiedene Bindungsstellen für Rezeptoren. Eigenständige Bereiche auf diesen Peptiden binden an menschliche Glykoproteine, Speichelagglutinine, an andere Mikroorganismen und Calcium [29, 151].

**Weitere bakterielle Adhäsine** sind Glycosyltransferasen und Glucanbindungsproteine. Sie können mit Rezeptoren in der Pellikel wie blutgruppenspezifischen Proteinen oder mit adsorbierten Dextranen und Glucanen interagieren [151].

**Bakterienbindende Pellikelbestandteile:** Wie bereits in Kapitel 2.2.2.3 angedeutet, dient eine Vielzahl von Pellikelbestandteilen den genannten Adhäsinen als Rezeptor für eine spezifische Bindung, so z.B. Agglutinin, Albumin, Amylase, Calgranulin, Carboanhydrasen, Cystatin, Cytokeratin, Fibrinogen, Fibronectin, bakterielle Bestandteile wie Glycosyltransferasen und Glucan, Histatin, IgG, IgM, sIgA, Laktoferrin, Lysozym, Muzine, Neuraminidase, PRPs, Statherin und Peroxidase [95, 151]. Neben den in Kapitel 2.2.2.3 beschriebenen und deshalb an dieser Stelle nicht mehr explizit dargestellten Pellikelkomponenten wie Muzinen, Statherin und PRPs sind vor allem Pellikelenzyme wie Amylase und Glycosyltransferasen von Bedeutung, da sie einen fördernden Einfluss auf die Adhäsionsprozesse haben, indem sie für Bakterien eine Nahrungsquelle darstellen oder mobilisieren [95, 202]. Beide Enzyme können bereits in der initialen Pellikel in enzymatisch aktiver Form nachgewiesen werden und beeinflussen den Kohlenhydratmetabolismus [95].

**Amylase** ist quantitativ betrachtet das wichtigste Speichelenzym, das vornehmlich aus der Glandula Parotis sezerniert wird und Stärke zu Oligosacchariden und Glucose hydrolysiert [202]. Die dadurch freigesetzten Zucker gelangen in das Zellinnere glycolytischer Bakterien und dienen als Substrat zur Energiegewinnung [202]. Zudem dient sie als spezifischer Rezeptor für verschiedene Streptokokken darunter auch *Streptococcus gordonii* [95, 151].

**Glycosyltransferasen** sind eine Familie extrazellulärer Enzyme aus Streptokokken, welche die  $\alpha$ -glycosidische Bindung von Saccharose nutzen, um aus den Glycosylresten extrazelluläre Polysaccharide (Glucane) zu synthetisieren. Möglicherweise nutzt die Glycosyltransferase dazu auch Mono- und Disaccharide wie Maltose, die als Abbauprodukt der Stärke von Amylase zur Verfügung gestellt werden. Die wasserunlöslichen Glucane kommen bereits in der Pellikel vor und sind als bakterielle Rezeptoren wirksam [95].

**Adhäsion von *Streptococcus gordonii* und *Actinomyces naeslundii***: Einzelne Pellikelbestandteile fördern die Kolonisierung einer Zahnoberfläche mit grampositiven, aerotoleranten Pionierkeimen wie *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp. und *Neisseriae* [202]. So stellen z.B.  $\alpha$ -Amylase, Fibronectin, MG2, Speichelagglutinin und PRPs Liganden für *Streptococcus gordonii* und MG2, Statherin und PRPs Rezeptorproteine für Adhäsine auf Typ-1-Fimbrien von *Actinomyces naeslundii* dar [94, 151, 202]:

- *Streptococcus gordonii* besitzt mehr als nur ein Adhäsion und kann an mindestens drei unterschiedliche Rezeptoren binden: an PRPs, an Speichelagglutinine und an Amylase aus dem Speichel [231]. Zu diesen Adhäsinen gehören möglicherweise Proteine der Zelloberfläche, die an Amylase binden und ein Lektin, das für Neuraminsäure spezifisch ist und an die PRPs und die Agglutinine bindet [151]. *Streptococcus gordonii* bindet über das Protein Hsa, das in hoch- und niederaffiner Form vorliegen kann, an  $\alpha$ -2-3-verknüpfte Sialinsäureenden von Muzin-Glykoproteinen, wobei diese Bindung durch einwirkende Abscherkräfte verstärkt wird [51].
- Der Kolonisierungsprozeß von Aktinomyzeten, an dem vor allem Lipoteichonsäuren und Fimbrien der *Actinomyces* spp. beteiligt sind, ist weitgehend aufgeklärt. Typ-1-Fimbrien, die man bei einer Gruppe von *Actinomyces naeslundii* findet, sind für die initiale Bindung an die Pellikel wichtig [177] und binden an Speichelproteine wie Statherin oder PRPs. Voraussetzung ist, dass diese Proteine an eine feste Unterlage gebunden sind [51, 108, 151, 231], da dabei wie beschrieben durch Konformationsänderung Bindungsstellen in Form von Polypeptidanteilen zugänglich werden. Eine Bindung von *Actinomyces naeslundii* über Typ-1-Fimbrien ist sehr stabil, da sie Lactose-unabhängig ist und damit nicht durch Galactoside inhibiert werden kann [138, 202]. Typ-1-Fimbrien sind somit für die stationäre Anlagerung verantwortlich; wenn lediglich Typ-2-Fimbrien vorliegen, rollen die Zellen über die Oberfläche [51]. Typ-2-Fimbrien, die auf der Oberfläche von allen *Actinomyces naeslundii* zu finden sind, sind mit einem galactosebindenden Lektin assoziiert, das die Anheftung an Wirtszellen oder andere Bakterien (Koaggregation) vermittelt [108, 151]. Dieses Lektin bindet Lactose-abhängig an Galactosereste, wie man sie in der Zellwand oraler Epithelzellen oder auch in Speichelglykoproteinen wie Muzinen findet [51].



Galactose ist hier Bestandteil einer endständigen Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure). Die Bindung an GalNAc $\beta$  Strukturen ist nur möglich, weil *Actinomyces* spp. eine Sialidase (Neuraminidase) besitzen, mit deren Hilfe Sialinsäure gespalten wird und so die als Kryptitope vorliegenden Bindungsstellen freigelegt werden [151, 202, 231]. Entsprechend der Bindungsspezifität ihrer Fimbrien binden *Actinomyces naeslundii* Stämme nicht an pufferbehandelte, aber an Speichel-, PRP-1- sowie Asialofuetin-konditionierte Oberflächen (Asialofuetin unterstützt die Bindung von Typ-2-Fimbrien) [51].

Neben der spezifischen Bindung hängt die Ansiedelung vieler oraler Bakterien direkt von ihrer Konzentration im Speichel ab. Circa zwei Stunden nach Zahnreinigung sind die beschriebenen Vorgänge abgeschlossen und die genannten Pionierkeime sind an den mit der Pellikel überzogenen Schmelz adsorbiert [151].

### 2.2.3.2 Plaque

Im Anschluss an die Bildung des initial entstandenen Biofilms kommt es zur Koaggregation und Koadhäsion weiterer Bakterien [95], wodurch die Vielfalt der Plaquemikroflora zunimmt und der Biofilm komplettiert wird [151]. Zu den sekundären Besiedlern zählen z.B. *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Capnocytophaga* spp., *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis*. Sie adhärieren nicht unmittelbar an die pellikelbedeckten oralen Oberflächen, sondern an bereits festhaftende Keime [231].

**Koaggregation und Koadhäsion:** Unter Koaggregation und Koadhäsion versteht man die interbakterielle Aggregation – eine Haftung von Bakterien an mikrobiellen Oberflächen, was eine wesentliche Voraussetzung für das Plaquewachstum ist [202]. In der Literatur finden sich verschiedene Definitionen zur Abgrenzung beider Begriffe: Laut Sanderink *et al.* wird mit bakterieller Koadhäsion die Erkennung und spezifische Haftung zweier genetisch identischer Bakterien aneinander beschrieben, mit bakterieller Koaggregation die Erkennung und spezifische Haftung zweier genetisch unterschiedlicher Bakterienarten [202]. Marsh/Martin zufolge versteht man unter beiden Begriffen die bei 18 Bakteriengattungen beobachtete, gegenseitige Erkennung von Zellen, die genetisch unterschiedlichen Typen von Partnerzellen angehören [151]. Bei Kolenbrander findet man eine wiederum abweichende Definition der Begriffe: Bei beiden Vorgängen handelt es sich um physikalisch-sterische Wechselwirkungen, die zwischen Zellen genetisch verschiedener Bakterienarten auftreten und der Zell-Zellkommunikation dienen [68]. Wenn diese Interaktionen zwischen suspendierten Zellen auftreten, spricht man von Koaggregation, wenn sie zwischen suspendierten und bereits im Biofilm anhaftenden Zellen auftreten, von Koadhäsion. Koaggregations- und Koadhäsionsvorgänge konnten für alle bislang aus der Mundhöhle isolierten Bakterien nachgewiesen werden [132].

Letztendlich scheint eine Unterscheidung der beiden Begriffe von untergeordneter Bedeutung zu sein, denn das Prinzip der Mechanismen ist identisch [132]: Auf einer Bakterienzelle können viele verschiedene der in Kapitel 2.2.3.1 vorgestellten Adhäsine vorhanden sein; weiterhin kann die Oberfläche des Wirts mehrere Rezeptoren enthalten. So exprimieren Bakterien auch Rezeptoren für Adhäsine auf anderen mikrobiellen Zelltypen, die für die Anheftung der koaggregierenden Partnerzellen aneinander dienen [132, 151]. Beispielsweise kann ein Protein auf *Streptococcus gordonii* sowohl mit Speichelproteinen wie PRPs, Speichelagglutininen und Amylase als auch mit *Actinomyces naeslundii* interagieren [151, 231]. An der Koaggregation sind oft auch Lektine beteiligt, die mit dem das komplementäre Kohlenhydrat enthaltenden Rezeptor auf einer anderen Zelle interagieren. Daher kann man die lektinvermittelte Interaktion zwischen Streptokokken und Aktinomyzeten durch die Zugabe von Galactose oder Lactose oder durch Behandlung des Rezeptors mit einer Protease hemmen [151, 231]. Der Aufbau der Zellverbindungen ist z.B. bei *Streptococcus mutans* mit unlöslichen  $\alpha$ -1,3-Glucanen assoziiert [202]. Die interzellulären Verbindungen werden zusätzlich dadurch gefördert, dass bereits gebundene Mikroorganismen jeweils erneut mit einer Speichelschicht überzogen werden, deren Glykoproteine (vor allem Muzine) die nachfolgende Haftung weiterer Bakterien vermitteln [151, 202].

Zudem führen beide Mechanismen zum selben Ergebnis: Im Fall der Koadhäsion kommt es zu einer Anhaftung einzelner Zellen an Pionierkeime, bei der Koaggregation entstehen Bakterienaggregate, die sich in Suspension befinden, aber schlussendlich ebenfalls an Biofilmstrukturen adhären. Insgesamt beeinflussen Koadhäsion und -aggregation die räumliche Organisation der mikrobiellen Gemeinschaft [132] und ermöglichen weitere Formen der Zell-Zell-Kommunikation wie den Austausch von Genen, Signalen [68, 132] oder Stoffwechselprodukten, welche agonistische oder antagonistische Wirkung ausüben können [132].

Untersuchungen an Aktinomyzeten und Streptokokken bestätigen, dass es bei koaggregierenden Keimen 5- bis 10-fach häufiger zur Zusammenlagerung der Keime kommt als bei nicht koaggregierenden Keimen [132]. Somit wird die frühe Ansammlung von Plaque sowohl durch die intragenerische Koaggregation zwischen Streptokokken und zwischen Aktinomyzeten wie auch durch die intergenerische Koaggregation zwischen Streptokokken und Aktinomyzeten erleichtert [132, 151]. Durch Veränderung des pH-Wertes, Modifizierung oder Freilegung neuer Rezeptoren und Bildung neuer Nährstoffe beeinflusst die von ihnen gebildete Pioniergemeinschaft das Muster der in geordneter Weise ablaufenden mikrobiellen Abfolge [151]. Beispielsweise wird Sauerstoff von den aeroben und fakultativ aeroben Arten verbraucht und durch Kohlendioxid oder andere Gase, die als Endprodukte des mikrobiellen Stoffwechsels entstehen, ersetzt. Durch den Stoffwechsel der Pionierarten werden auch zusätzliche Nährstoffe verfügbar und die Vielfalt der Mikroflora nimmt bezüglich der morphologischen Typen als auch der tatsächlichen Anzahl von Arten zu [151, 231]. Es kommt zu weiteren intergenerischen Koaggregationen zwischen

Gattungen wie *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Veillonella* spp. oder *Porphyromonas gingivalis* und den Erstbesiedlern [151]. Insbesondere Fusobakterienarten wie *Fusobacterium nucleatum* [202], der häufigste gramnegative Organismus in der dentalen Plaque [132], haben beim Plaquewachstum eine besondere Bedeutung, indem sie fähig sind, an sämtliche bisher bekannten oralen Mikroorganismen und zudem am Pellikelprotein Statherin zu binden. Untereinander gehen sie jedoch keine Koadhäsion ein. Da Spätbesiedler wie *Selenomonas* oder *Eubacterium* nicht mit Erstbesiedlern koaggregieren aber mit *Fusobacterium nucleatum* [151], ist dessen Haftung an Erstbesiedlern wie Streptokokken und Aktinomyzeten essentiell für die Ansiedelung von Nachfolgerkeimen [151, 202]. Fusobakterien fungieren damit als Brücke zwischen den Bakterien [132, 133, 151] und beeinflussen so die Struktur und räumliche Organisation der Plaque, wodurch sie z.B. anaerobe Mikroumgebungen für entsprechende Keime schaffen [132].

Die weitere Zunahme der Plaquemasse beruht innerhalb der ersten 24 Stunden zwar auch weiterhin auf der kontinuierlichen Anhaftung weiterer Mikroorganismen [94], vor allem aber auf Zellteilung und Proliferation [21, 202], die zur Bildung von Mikrokolonien führt [151]. Bakterielle Mikrokolonien werden lokalisationsabhängig nach zwei bis 15 Stunden auf der Schmelzoberfläche angetroffen [94]. Ein weiteres wichtiges Stadium bei der Entwicklung von Plaque ist die Bildung von extrazellulären Polysacchariden, die zusammen mit bakteriellen extrazellulären Schleimen und zusätzlichen Schichten von adsorbierten Proteinen und Glykoproteinen aus dem Speichel die Mikrokolonien umgeben [151]. Bei fortschreitender Reifung entsteht auch zunehmend die extrazelluläre Matrix der Plaque [95] (siehe Abschnitt „Plaque“). Insgesamt ergibt sich die Ansammlung von Plaque aus dem Gleichgewicht zwischen Anheftung, Wachstum und Entfernung von Mikroorganismen, wobei die Ablösung von Zellen aus dem Biofilm in den Speichel die Kolonisierung von frischen Standorten ermöglicht [70, 151]. Die Ablösung von Zellen kann einen aktiven Prozess als Reaktion auf die Zelldichte oder veränderte Substratkonzentrationen darstellen oder auf hydrodynamischen Kräften beruhen [70, 132]. Nur im Bereich von Oberflächenrauigkeiten eines Festkörpers oder in Regionen der Zahnreihe, die mechanisch-abrasiven Einwirkungen nicht zugänglich sind, können Mikroorganismen aus dem Speichel dauerhaft adhären und proliferieren [94].

**Plaque:** Nach circa 24 Stunden [99] hat sich durch Koadhäsion, Koaggregation und Proliferation der adhären Organismen eine ausgereifte Plaque entwickelt [151, 231], die man als strukturierten, zähen, verfilzten Zahnbelag aus Speichelbestandteilen, mikrobiellen Stoffwechselprodukten, Nahrungsresten und Mikroorganismen beschreiben kann [99]. In der Plaque ist die komplexe mikrobielle Gemeinschaft in eine organische Matrix eingebettet [151].

In etablierten oralen Biofilmen, die eine Dicke von mehreren hundert Mikrometern erreichen können [132], machen Bakterien zwischen 70 und 80% der Masse aus [99, 202]. Bei elektronenmi-

kroskopischen Untersuchungen kann man sowohl Bereiche mit Palisaden, in denen Kokken und Filamente parallel zueinander und im rechten Winkel zur Schmelzoberfläche angeordnet sind, als auch Mikrokolonien erkennen. Zudem gibt es zahlreiche Verbindungen zwischen Bakterien, in denen Kokken entlang filamentartiger Organismen angeordnet sind. Solche Gebilde werden als Maiskolben bezeichnet [151]. Die bakterielle Zusammensetzung ist räumlich verschieden und unterliegt einem zeitlichen Wandel, z.B. dominieren bei Erwachsenen in der Zahnhalsregion und auf Zahnprothesen Streptokokken (40%) und Aktinomyzeten (35%) die Plaque [132,202]; wenn sich Plaque ungestört bilden kann, verschieben sich die Anteile der Bakterien im Biofilm. Nach sieben Tagen stellen Streptokokken immer noch die Hauptgruppe der Mikroorganismen in der Plaque dar, nach vierzehn Tagen beträgt ihr Anteil jedoch nur noch circa 15% der kultivierbaren Mikroflora und anaerobe Stäbchen und Filamente überwiegen [151].

Die Matrix beansprucht etwa 20–40% des gesamten Plaquevolumens und enthält als Hauptbestandteil von den Bakterien gebildete extrazelluläre Polysaccharide in Form von wasserlöslichen und -unlöslichen Glucanen [95], die durch Glucosyltransferasen (GTFs) gebildet werden. GTFs können ausgeschieden werden und an andere Bakterien oder Zahnoberflächen adsorbieren und so einen Teil der Pellicel bilden. In beiden Fällen können die GTFs ihre Funktion beibehalten und zur Plaquebildung beitragen. *Streptococcus gordonii* besitzt nur eine einzige GTF, die jedoch in Abhängigkeit von den vorherrschenden Umweltbedingungen sowohl lösliches als auch unlösliches Glucan bilden kann. Die löslichen Glucane sind weniger beständig, können aber von anderen Bakterien verstoffwechselt werden. Die unlöslichen Glucane spielen für die Aufrechterhaltung der Plaquestruktur eine Rolle. Besonders die Bildung von wasserunlöslichem Mutan durch *Streptococcus mutans* trägt in bedeutendem Maße zur strukturellen Integrität der Plaque bei und hilft bei der Aufrechterhaltung von Kanälen in der Plaque [151]. Weiter enthält die Matrix aus dem Speichel stammende Glykoproteine, Nahrungsbestandteile, Nukleinsäuren, Bestandteile der Sulkusflüssigkeit und Zellreste. Die wenigen Lipide, die in der extrazellulären Matrix vorhanden sind, stammen aus kleinen extrazellulären Membranvesikeln von gramnegativen Bakterien und weisen eine Endotoxinwirkung auf [70,202]. Die Matrix dient als Gerüst, um die Mikroorganismen zu einer kohärenten Masse zu vereinen, und weiterhin als Nahrungsspeicher für die Bakterien [151,202]. Insgesamt hat Zahnplaque eine offene Struktur, in der man regelmäßig Wasserkanäle findet [70,151,231], die u.a. der Versorgung mit Nährstoffen dienen [70]. Eine schematische Darstellung der dentalen Plaque findet sich in Abbildung 2.2.

**Biofilm:** Von entscheidender Bedeutung ist, dass es sich bei Plaque um einen mikrobiellen Biofilm handelt: Biofilme sind räumlich organisierte Gemeinschaften von Mikroorganismen, welche mit einer Oberfläche verbunden und in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind [70,132,151]. Innerhalb des Biofilms existieren die Bakterien nicht als unabhängige Individuen, sondern wirken als mikrobielle Gemeinschaft zusammen, deren Eigenschaften und Fähigkeiten mehr sind

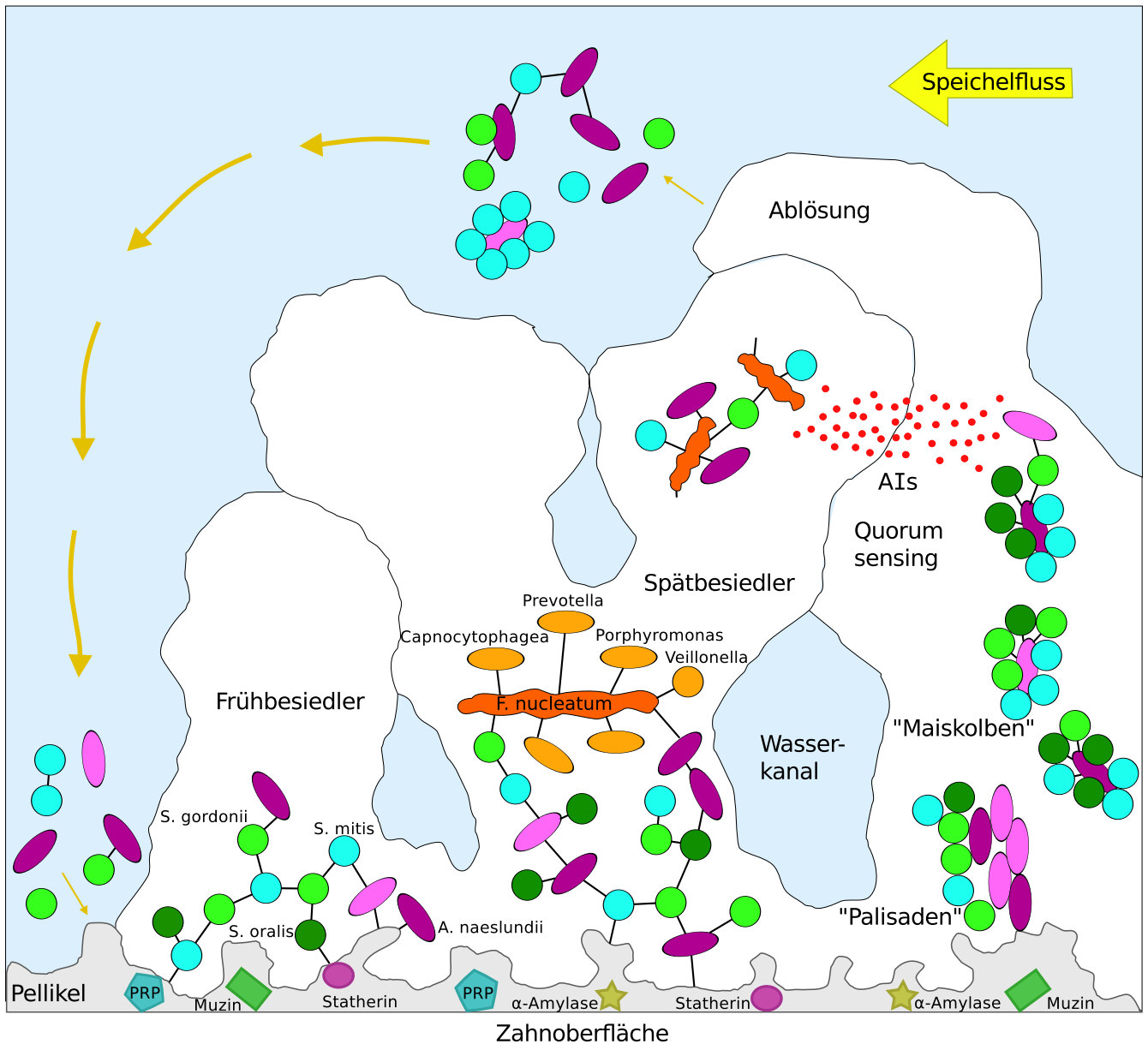


Abbildung 2.2: Entstehung und Aufbau der dentalen Plaque

Frühbesiedler (v.a. Streptokokken und Aktinomyzeten) adhärieren an Bestandteile der Pellikel, die die Zahnoberfläche bedeckt. Spätbesiedler ergänzen den initialen Biofilm, wobei *Fusobacterium nucleatum* eine Schlüsselrolle spielt. Zwischen den Mikrokolonien der löchrig strukturierten Plaque kommt es über Autoinducer (AIs) zur Zell-Zell-Kommunikation („Quorum Sensing“). Durch die abscherende Wirkung des Speichelflusses wird die Kolonisierung frischer Standorte ermöglicht. (Einzelheiten im Text)

als die Summe der Eigenschaften und Fähigkeiten ihrer Mitglieder [231]. Beispielsweise wird anaeroben Bakterien das Überleben unter aeroben Bedingungen erst durch das Wachstum in einem Biofilm ermöglicht, da ebenfalls anwesende Aerobier die Sauerstoffkonzentration gering halten [132].

Biofilme können als eine geschützte Form des mikrobiellen Wachstums gesehen werden, welche die Überlebensfähigkeit von Organismen in einem ungünstigen Milieu erhöht und ihr Zusammenleben in einer komplizierten, aber sehr effizienten Art ermöglicht [202]. Beispielsweise gibt es in Plaque von vielen Parametern, die Wachstum und Überleben von Mikroorganismen beeinflussen, Gradienten, die sich über kurze Entfernungen (wenige Mikrometer) erstrecken. Eng benachbarte Standorte können sich somit in der Konzentration von wichtigen Nährstoffen und toxischen Stoffwechselprodukten sowie im pH-Wert erheblich unterscheiden, wodurch Mikroumgebungen entstehen [151]. Zudem findet man in Biofilmen leere Zwischenräume und Wasserkanäle [151, 202]. Die entsprechende Oberflächenvergrößerung bzw. die dadurch erhöhte Diffusion ermöglichen den Mikroorganismen einen verbesserten Zugriff auf Nährstoffe und einen verbesserten Abtransport von metabolischen Endprodukten [231]. Die pilzförmige Anordnung der Bakterienagglomerate bzw. die gestielte Verbindung zur Unterlage führt zur Anwesenheit multipler, zentral lokalisierter sauerstoffarmer Areale [151, 202]. Die heterogene Umgebung, die durch den Biofilm entsteht, fördert die Vielfalt an Geno- und Phänotypen, wodurch Eigenschaften wie Bewegung, Nährstoffaufnahme und Biofilmbildung beeinflusst werden [231].

Das Wachstum in einem Biofilm schützt seine Zellen vor Austrocknung und antimikrobiellen Stoffen, bietet Retention im Fließsystem und erleichtert den Austausch von Stoffwechselprodukten [151]. Der Schutz der Bakterien im Biofilm beruht vor allem auf der extrazellulären Matrix, der Glykokalix, die dadurch entsteht, dass die Bakterien auf ihre Oberfläche schleimige, gummiartige Substanzen (oft Glycoside) sezernieren [202], die dann als dicke, kontinuierliche, hydratisierte, geladene Schicht die Zellen umgeben [151]. Die Produktion der Glykokalix beruht auf veränderter Genexpression [202]. Veränderte Genexpression und Wachstumsraten sind typisch für Bakterien, die Teil eines Biofilms sind (mehr als 50% der exprimierten Proteine unterscheiden sich zwischen Biofilm-Bakterien und ihrem planktonischen Gegenpart [70]) und stellen eine Anpassungsreaktion an die veränderte Umgebung dar, in der die Bakterien mit begrenzter Nährstoffverfügbarkeit, ungünstigem pH-Wert, höherer Osmolarität und Zelldichte konfrontiert sind [70, 151]. Auch der Kontakt mit einer Oberfläche, der für einen Biofilm obligatorisch ist, kann die Expression spezifischer Gene induzieren [151]. Durch Zell-Zell-Kommunikation („Quorum Sensing“) mittels autoinduzierender Signalmoleküle wird die Genexpression der einzelnen Bakterien [202] aufeinander abgestimmt, d.h. die Mikroorganismen verhalten sich nicht mehr als Einzeller, sondern als mehrzelliger Organismus, dessen Bestandteile eng miteinander kommunizieren [70]. Wenn man bedenkt, dass über 500 genetisch verschiedene Bakterienarten

im Biofilm zusammenleben [70,132] und das Wachstum in einem Biofilm im Vergleich zu dem in planktonischer Phase erhebliche metabolische und strukturelle Unterschiede mit sich bringt [70], wird deutlich, wie wichtig diese Kommunikation ist, denn nur durch sie ist ein kontrolliertes Zusammenleben der Bakterien möglich. Sie ist z.B. der Grund dafür, dass man bestimmte Spezies in einem Biofilm als Gemeinschaft antrifft [132]. Der Einfluss der Lebensform „Biofilm“ auf die Genexpression wird anhand der veränderten Phänotypen sichtbar [70,151]. Beispielsweise verlieren Bakterien, die in einem Biofilm resistent gegen Antibiotika waren, in gelöster Form diese Resistenz.

Abscherkräfte scheinen ebenfalls eine wichtige Bedeutung für die Entstehung und den Aufbau eines Biofilms zu haben: Bakterienstämme, die die Fähigkeit des „Quorum sensing“ nicht besitzen, können unter statischen Bedingungen keinen Biofilm bilden, sehr wohl aber unter Einwirkung von Abscherkräften. Bei deren Anwesenheit zeigen Biofilme eine stärkere Kohäsion und Adhäsion an die Oberfläche. Dieses Phänomen kann durch einen veränderten Phänotyp, verstärkten Nährstofftransport, dichtere Packung der extrazellulären Matrix oder Selektionsmechanismen erklärt werden [70].

**„Quorum Sensing“:** Wie bereits erwähnt, beginnen die Zellen eines Biofilms untereinander Signale auszutauschen und sich neu zu organisieren, wenn sich genügend Bakterien zu einem sogenannten „Quorum“ angesammelt haben. Die über den Signalaustausch stattfindende Zell-Zell-Kommunikation bezeichnet man als „Quorum Sensing“ [202]. Sie verleiht Einzellern die Fähigkeit, über chemische Kommunikation die Zelldichte der Population messen zu können und erlaubt es den Zellen einer Suspension, bestimmte Gene nur dann zu aktivieren, wenn eine bestimmte Zelldichte über- oder unterschritten wird [15,54,70]. Dadurch können Prozesse koordiniert werden, die ineffizient wären, wenn sie nur von einzelnen Zellen durchgeführt würden, z.B. Biolumineszenz, die Bildung von Biofilmen oder die Sekretion von Antibiotika oder Pathogenitätsfaktoren [15,54]. „Quorum Sensing“ beinhaltet Mechanismen wie Plasmidtransfer sowie die lokale Synthese von Antibiotika, Enzymen und Detergenzien, und basiert auf selbst generierten chemischen Signalen (sog. „Autoinducers“ (AIs)): Einzelne Bakterien setzen AIs in so kleinen Mengen frei, dass diese von der Umgebung nicht wahrgenommen werden. Wenn genügend Bakterien vorhanden sind bzw. durch die im Biofilm vorhandene Matrix die chemischen Signalmoleküle genügend angereichert sind, übersteigt die lokale AI-Konzentration einen Schwellenwert, welcher die Bakterien auf ihre Anzahl hinweist bzw. eine Kaskade von Signalübertragungen auslöst [64,202,243], indem über einen spezifischen Rezeptor die Autoinduktion einsetzt. Dies geschieht, indem unter anderem Gene aktiviert werden, die den Autoinduktor produzieren: Es setzt eine positive Rückkopplung ein, die zu einer vollständigen Aktivierung des Rezeptors führt, was wiederum die Regulation anderer Gene zur Folge hat [243]. Bestimmte Gene werden aktiviert, andere hingegen unterdrückt [64,202,243]. Die Wachstumsrate wird

z.B. gesteigert, sobald eine kritische Anzahl von Organismen  $((2 - 6) \times 10^6$  Zellen pro  $\text{mm}^2$ ) wahrgenommen wird. Sie steigt, bis eine höhere Zelldichte erreicht ist und wird dann wieder verringert. Die Expression der Gene für GTFs wird ebenfalls erhöht [151].

Bei den sezernierten Signalmolekülen, die als Autoinduktoren bzw. Pheromone wirken, handelt es sich im Falle von Autoinducer-1 (AI-1) um N-Acyl-Homoserin-Lacton (Acyl-HSL), das der innerartlichen Kommunikation dient, bei Autoinducer-2 um einen zyklischen Furanosyl-boratediester, der der Kommunikation zwischen verschiedenen Bakterienarten dient. Die Natur des Autoinducer-3 ist unbekannt [243]. Daneben wirken Peptide als Effektormoleküle der grampositiven Bakterien [151]. N-Acyl-Homoserin-Lactone spielen bei einer Vielzahl gramnegativer „Quorum Sensing“-Systeme eine bedeutende Rolle [151, 202]. Das Gen, das für AI-2 kodiert, konnte bei grampositiven und gramnegativen Bakterien nachgewiesen werden. Dieser Autoinducer kontrolliert die genau definierte Abfolge der Bakterienansiedelung und -anordnung beim Aufbau eines Biofilms. Beispielsweise kann *Streptococcus gordonii* bei Abwesenheit von AI-2 keinen Biofilm aufbauen, der neben *Streptococcus gordonii* noch andere Keime enthält [70].

#### 2.2.4 Eigenschaften und gegenseitige Beeinflussung von *Streptococcus gordonii* und *Actinomyces naeslundii*

In Kapitel 2.2.3.2 wurde beschrieben, dass sich orale Keime durch Koaggregation und Koadhäsion bei der Bildung von Plaque und der Kolonisierung oraler Oberflächen beeinflussen, was neben dem Austausch genetischer Information zu einem großen Teil darauf beruht, dass das enge Zusammenleben der Bakterien eine metabolische Kommunikation ermöglicht [132]. Insbesondere ließ sich auch für *Streptococcus gordonii* und *Actinomyces naeslundii* ein derartiges Zusammenwirken nachweisen, das vielfach untersucht wurde. Die wichtigsten Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen sind folgende:

- Beide Arten zählen zu den sogenannten Frühbesiedlern der Zahnoberfläche [68] und besitzen ausgeprägte hydrophobe Oberflächeneigenschaften, die häufig mit spezifischen Oberflächenstrukturen (Fimbrien, Filamente) assoziiert sind und zur Überbrückung der elektrostatischen Barriere beitragen, wodurch eine irreversible bakterielle Adhäsion ermöglicht wird [76, 94].
- Sowohl bei Experimenten *in vitro*, bei denen Zellen verschiedener Stämme beider Arten in standardisiertem Koaggregationspuffer, Speichel oder bestimmten Wachstumsmedien suspendiert wurden [114], als auch *in vivo* [177] konnte gezeigt werden, dass die beiden Mikroorganismen koaggregieren können [68]. Die Koaggregation beruht auf unterschiedlichen Interaktionen; so ist ein hitzeempfindliches Lektin auf *Streptococcus gordonii* und



eine hitzeresistente Kohlenhydratstruktur auf *Actinomyces naeslundii* beteiligt [43]. Desweiteren kann speziell bei *Streptococcus gordonii* DL1 die Koaggregation mit *Actinomyces naeslundii* über ein Lipoprotein auf der Streptokokkenoberfläche vermittelt werden, das ein hochaffiner Transporter für  $Mn^{2+}$  ist, anderen Biofilmbakterien eine  $Mn^{2+}$ -Quelle zur Verfügung stellt und als Adhäsion wirkt. Man konnte zeigen, dass sich die Koaggregation der beiden Keime selbst reguliert, indem sie dafür sorgt, dass Oberflächenproteine der Streptokokken teilweise verstärkt, teilweise vermindert exprimiert werden [132]. Um bei Experimenten *in vitro* die Koaggregation beider Keime zu fördern sollten diese durch Vortexen gemischt werden, anderenfalls bilden sich lediglich Kokulturen, die erst nach Verlängerung der Inkubationszeiten über sechs Stunden Koaggregate bilden [51].

- In Versuchen *in vitro* unter dynamischen Bedingungen mit sequentieller Zugabe beider Keime bzw. Inokulation von Koaggregaten konnte gezeigt werden, dass sich sowohl *Streptococcus gordonii* als auch *Actinomyces naeslundii* ansiedelt, aber nur *Streptococcus gordonii* – unabhängig von der Inkubationsreihenfolge – ein signifikantes Wachstum zeigt und in den entstandenen Biofilmen das größte Volumen einnimmt; auch bei Inokulation von Koaggregaten nimmt *Streptococcus gordonii* den größten Teil des Biofilmvolumens ein, jedoch ist dieses zum einen kleiner als bei sequentieller Zugabe der beiden Keime, zum anderen ist auch der relative Anteil von *Streptococcus gordonii* geringer – zugunsten von *Actinomyces naeslundii*, das sich nur vermehrt, wenn es in Form von Koaggregaten vorliegt. *Streptococcus gordonii* hingegen wächst unabhängig von *Actinomyces naeslundii* aber auch als Koaggregat [68]. Andererseits wurde festgestellt, dass *Streptococcus gordonii* in Koaggregaten mit *Actinomyces naeslundii* schneller adhärert, eine höhere Wachstumsrate hat, aber nach sieben Stunden keine höhere Zellzahl erreicht als bei monokulturellem Wachstum und dass die Wachstumsrate von *Actinomyces naeslundii* durch die Koaggregation mit *Streptococcus gordonii* wenig beeinflusst wird. Weitere Untersuchungen zum Verhalten der beiden Keime kamen zu dem Schluss, dass *Streptococcus gordonii* durch die Anwesenheit von *Actinomyces naeslundii* wenig in seinem Wachstum beeinflusst wird und *Actinomyces naeslundii* bei Koaggregation mit *Streptococcus gordonii* kein Wachstum zeigt [176]. Diese abweichenden Ergebnisse sind unter anderem durch unterschiedliche Inkubationsbedingungen, Versuchsaufbauten und verwendete Bakterienstämme erklärbar [70].
- *In vivo* wirkt sich die Koaggregation zwischen den beiden Mikroorganismen auf die Biofilmbildung und Kolonisierung aus: die Besiedelung mit *Actinomyces* ist höher, wenn Rezeptorpolysaccharid-tragende Streptokokken anwesend sind [177], da Aktinomyzeten über eine Bindung an diese RPS eine verbesserte Retention im Biofilm ermöglicht wird,

was man experimentell auch für *Streptococcus gordonii* und *Actinomyces naeslundii* unter Fließkammerbedingungen nachweisen konnte [115]. In Biofilmen neigt *Actinomyces naeslundii* dazu, an *Streptococcus gordonii* zu adhären [176]. Andererseits profitiert auch *Streptococcus gordonii* von der Koaggregation mit *Actinomyces naeslundii*, denn dadurch werden Gene, die für die Biofilmbildung wichtig sind, hochreguliert [114].

- *Streptococcus gordonii* bildet als Mitglied der Viridansstreptokokken das Hämolyisin  $H_2O_2$  [132]; es synthetisiert aber keine Katalase, weshalb auch seine eigenen Argininreste, die die Wirkung eines schützenden Antioxidans haben, von  $H_2O_2$  angegriffen werden. Zudem kann *Streptococcus gordonii* nur ineffizient Arginin produzieren; dadurch, dass *Actinomyces naeslundii* mit seiner Katalase  $H_2O_2$  aus der Umgebung von *Streptococcus gordonii* entfernt, wird weniger Arginin aus dem intrazellulären Argininpool von *Streptococcus gordonii* verbraucht und somit macht sich seine mangelhafte Argininbiosynthese nicht so stark im Wachstum von *Streptococcus gordonii* bemerkbar wie in Abwesenheit von *Actinomyces naeslundii* [115]. *Streptococcus gordonii* wird also vor oxidativem Schaden geschützt, indem *Actinomyces naeslundii* durch seine Katalase  $H_2O_2$  entfernt [134]. Zudem können in Koaggregaten Argininreste auf der Zellwand von Aktinomyzeten von *Streptococcus gordonii* als Argininquelle genutzt werden. Weiterhin ist durch die verminderte  $O_2$ -Konzentration in einer Mikroumgebung eine gesteigerte Effizienz der Argininbiosynthese zu erwarten, die den Aufbau eines intrazellulären Argininpools ermöglicht [114]. Wenn *Streptococcus gordonii* allerdings in großen Mengen vorliegt, wird durch das von *Streptococcus gordonii* produzierte, antibakteriell wirkende  $H_2O_2$  *Actinomyces naeslundii* inhibiert, wodurch letztlich aber auch die Streptokokkenzahl reduziert wird, da die schützende Wirkung von *Actinomyces naeslundii* für *Streptococcus gordonii* ausfällt [115].

Die durch Koaggregation vermittelte Wechselwirkung der beiden Keime ist auch an der Stabilisierung der Argininbiosynthese von *Streptococcus gordonii* durch *Actinomyces naeslundii* erkennbar: Ohne Koaggregation mit *Actinomyces naeslundii* reagiert *Streptococcus gordonii* auf geringe äußere Argininkonzentrationen mit einer Steigerung der Genexpression von Enzymen, die an der Argininbiosynthese beteiligt sind. In Koaggregaten – aber nicht in Kokulturen – findet diese Reaktion nicht statt; es erfolgt vielmehr eine „Down“-Regulation der entsprechenden Gene, was sinnvoll ist, denn aufgrund der eben beschriebenen schützenden Wirkung von *Actinomyces naeslundii* ist eine ausgeprägte Argininbiosynthese nicht nötig [114].

Insgesamt lässt sich feststellen, dass *Actinomyces naeslundii* die Abhängigkeit von *Streptococcus gordonii* von der extrazellulären Argininkonzentration reduziert und somit dessen Wachstum, Überleben und die Kolonisierung oraler Oberflächen durch *Streptococcus gor-*

*donii* bei geringen Konzentrationen an frei verfügbarem Arginin, wie sie in der Mundhöhle und im Speichel vorliegen, fördert [114].

- Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung besteht darin, Stoffwechselprodukte und Enzyme des Koaggregationspartners zu nutzen: *Actinomyces naeslundii* kann im Gegensatz zu *Streptococcus gordonii* durch seine Sialidase Sialinsäuren freisetzen, die dann *Streptococcus gordonii* als Nährstoff dienen. *Actinomyces naeslundii* kann einige glykolytische und proteolytische Enzyme nutzen, die es selbst nicht synthetisieren kann, die aber von *Streptococcus gordonii* zur Verfügung gestellt werden [115].

## 2.3 Untersuchte Werkstoffe – Struktur und Eigenschaften

Die Materialien, die in der vorliegenden Untersuchung hinsichtlich ihrer Kolonisierung mit den koaggregierenden oralen Keimen *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V untersucht wurden, waren Girobond®NB, IPS Empress®2, Sinfony™ und Palapress®Vario. Es handelt sich dabei um Vertreter der Werkstoffgruppen Nichtedelmetalllegierungen, Verblendkeramiken, Verblendkunststoffe und Prothesenkunststoffe.

### 2.3.1 Nichtedelmetalllegierungen

#### 2.3.1.1 Allgemeines

Da Nichtedelmetalllegierungen (NEM) zum einen eine vergleichsweise kostengünstige Herstellung von Zahnersatz erlauben und andererseits werkstoffkundliche Vorteile gegenüber Edelmetalllegierungen (EM) aufweisen, stellen sie eine Alternative zu diesen dar [72, 153]. NEM-Legierungen können bei allen denkbaren zahnärztlich-prothetischen Konstruktionen verwendet werden, wobei aufbrennfähige NEM-Legierungen vor allem für festsitzenden und nichtaufbrennfähige NEM-Legierungen vor allem für herausnehmbaren Zahnersatz verwendet werden. Diese vielfältigen Einsatzmöglichkeiten sind durch das weite Spektrum ihrer mechanischen Eigenschaften begründet [72].

Die mechanischen Eigenschaften der NEM-Legierungen sind von ihrem Gefüge abhängig, das meist mehrphasig und heterogen ist und meist eine fein verästelte dendritische Mikrostruktur aufweist, die für die hohe Härte der NEM-Legierungen verantwortlich ist [72]. Neben der höheren Härte haben sie eine niedrigere Wärmeleitfähigkeit als EM-Legierungen und üben daher geringere thermische Reize auf die Pulpa aus. Eine weitere positive Eigenschaft aus Sicht des Patienten ist die im Vergleich zu EM-Legierungen deutlich geringere Dichte, die sich durch ein spürbar geringeres Gewicht des Zahnersatzes bemerkbar macht [72, 153]. Aufgrund eines gegen-

über EM-Legierungen etwa doppelt so hohen E-Moduls kann graziler oder über eine größere Spanne modelliert werden, was auch in parodontalhygienischer Hinsicht bedeutsam ist [72]. Der für die werkstoffkundlichen Merkmale verantwortliche innere Aufbau einer Legierung wird durch ihre chemische Zusammensetzung bestimmt. Metalle wie Nickel, Kobalt und Chrom, die wichtige Bestandteile von NEM-Legierungen sind, werden mit Hypersensitivität, Toxizität und Kanzerogenität in Verbindung gebracht, während die daraus gefertigten NEM-Legierungen – soweit sie einen ausreichend hohen Chrom- und Molybdängehalt aufweisen – im Allgemeinen als biokompatibel gelten, da es bisher keinen klinischen Anhaltspunkt dafür gibt, dass aus Dentallegierungen herausgelöste Bestandteile durch Aufnahme mit dem Speichel toxisch oder kanzerogen wirken. Die Bedenken von Seiten des Patienten haben sich weitgehend auf allergologische Aspekte reduziert. Eine Sensitivität gegenüber Kobalt und Chrom ist im Vergleich mit Nickel seltener anzutreffen. Unverträglichkeitsreaktionen setzen Korrosionsvorgänge, also die Freisetzung von Metallbestandteilen, voraus, die dann als Metall-Protein- oder Metall-Zell-Komplexverbindung biologische Schädigungen hervorrufen [72]. Generell gilt, dass jede Legierung im Speichel korrodiert [44]. Die Höhe der Korrosionsrate wird im wesentlichen von der chemischen Zusammensetzung und dem Gefüge der jeweiligen Legierung bestimmt, denn diese Faktoren beeinflussen den Aufbau und die Beständigkeit der vor Korrosion schützenden Passivschicht, bei der es sich um eine Schicht aus Oxiden und Hydroxiden handelt, die als Diffusionsbarriere wirkt. Die Adsorption organischer Speichelbestandteile auf der Metalloberfläche wirkt ebenfalls korrosionshemmend. Die Reaktionen zwischen der Legierung und dem Körpergewebe werden, solange die Passivschicht nicht verletzt wird, also nicht vom Metall selbst, sondern von der Oxidschicht bestimmt. Bei Korrosion kommt es zu einem Zusammenbruch der Passivität. Die wichtigsten für die Passivschichtbildung hinzulegierten Metalle bei NEM-Legierungen sind Chrom, Molybdän und Wolfram [72].

### **2.3.1.2 Girobond®NB – eine CoCrMo-Legierung**

Die Gruppe der NEM-Legierungen umfasst Kobalt-, Nickel- und Titanlegierungen. Außerdem zählen Eisenlegierungen und Stähle dazu, sie werden jedoch nicht mehr oder nur sehr selten eingesetzt. Die Kennzeichnung von Legierungen erfolgt nach dem Massegehalt der darin enthaltenen Elemente in absteigender Reihenfolge [72]. Vom Hersteller Amann-Girrbach (Pforzheim, D) wird die chemische Zusammensetzung von Girobond®NB in Masseprozent wie folgt angegeben: Co 62,5%, Cr 25%, Mo 5%, W 5%, Si 1%, Ce, Nb, Fe, N < 1%; somit handelt es sich um eine kohlenstofffreie CoCrMo-Legierung [9].

Das heutige Wissen über Kobalt-Basislegierungen geht auf den deutschen Physiker Tammann zurück, der das Zweistoffsystem Co-Cr untersuchte und 1908 von der großen Härte und Sprö-

digkeit der Legierung berichtete. Ab 1929 versuchten die amerikanischen Forscher Erdle (Zahn-techniker) und Prange (Dipl.-Ing.) diese Legierung für die Zahnmedizin nutzbar zu machen, was ihnen durch das Hinzufügen weiterer Legierungsbestandteile gelang. 1932 wurde die vergießbare CoCr-Legierung Vitallium in die Zahnmedizin eingeführt, die in nahezu unveränderter Form den Grundbaustein der heutigen CoCr-Legierungen lieferte. Neben der guten Vergießbarkeit weisen sie aufgrund ihrer Korrosionsbeständigkeit auch ein günstiges biologisches Verhalten auf, weshalb CoCr-Legierungen bereits seit Jahrzehnten als Implantatwerkstoffe benutzt werden [72, 222].

Die meisten der heute verfügbaren CoCr-Legierungen basieren auf dem Dreistoffsystem Co-Cr-Mo. Kobalt prägt als Basis der CoCr-Legierungen ihre mechanischen Eigenschaften, die Dünnflüssigkeit der Schmelze und trägt durch Oxidbildung (CoO) zur Passivierung bei. Chrom ist der wesentliche Bestandteil zur Verbesserung der Korrosionsbeständigkeit, zu deren Gewährleistung CoCr-Legierungen mindestens 25 Massenprozent Chrom benötigen. Die großen Cr-Ionen verursachen Gitterspannungen und verbessern dadurch die mechanischen Eigenschaften. In Verbindung mit anderen Elementen wie Kohlenstoff wirkt es härtend. Molybdän wirkt stabilisierend auf das Gefüge und erhöht ebenfalls die Korrosionsbeständigkeit. Der Molybdän-gehalt liegt meist um fünf Massenprozent [72].

Die Gruppe der CoCr-Legierungen kann wie alle NEM-Legierungen in aufbrennfähige und nicht aufbrennfähige Legierungen unterteilt werden [72]. Bei Girobond®NB handelt es sich um eine Aufbrennlegierung für die Kronen- und Brückentechnik. Aufgrund ihrer hohen mechanischen Werte ist sie laut Herstellerangaben aber auch als Universallegierung für Modellguß-Klammerprothesen, großspannige Teleskoparbeiten und grazile Superkonstruktionen einsetzbar. Durch die Dotierung mit Niob besitzt Girobond®NB ein feinkörniges Gefüge, das eine dichte, leicht auf Hochglanz zu polierende Oberfläche ermöglicht [9].

## 2.3.2 Keramik

### 2.3.2.1 Allgemeines

Keramiken sind die Werkstoffe, die in ihren Eigenschaften den natürlichen Zähnen am nächsten kommen – sowohl in ästhetischer als auch funktioneller Hinsicht [180]. Sie besitzen eine zahnähnliche Farbe und Transparenz, ausreichende Resistenz gegenüber Mundhöhleneinflüssen, Biokompatibilität, hygienefähige Oberflächen und gute mechanische Parameter [71, 257]. Keramik gilt als Mittel der Wahl, wenn es um den Ersatz von verlorengegangener Zahnhartsubstanz geht [180].

Dentalkeramische Massen leiten sich zwar vom Porzellan ab, unterscheiden sich aber in der Zusammensetzung deutlich. Die Hauptbestandteile sind Feldspat und Quarz mit 60–80 bzw.

15–25 Gew.%, während Kaolin, die wichtigste Komponente der Porzellane, nur 0–5 Gew.% beiträgt. Desweiteren findet man Zusätze wie Trübungsmittel, Farbzusätze, Fluoreszenzbildner, gefügeverstärkende Kristallite und Flussmittelzusätze [71].

Bezüglich ihrer Struktur und Verarbeitung nehmen dentalkeramische Produkte eine Zwischenstellung zwischen Keramik und Glas ein. Sie verfügen über eine amorphe transparente Glasphase, in die kristalline Strukturen eingelagert sind. Art, Anteil, Verteilung, Form und Verbund der Gefügebestandteile bestimmen die Eigenschaften. Die Glasphase beeinflusst vorrangig Fließverhalten, Benetzbarkeit und Transparenz, die kristalline Phase bestimmt die Standfestigkeit der Schmelze, Wärmedehnung und chemische Resistenz [71]. Die mechanischen Eigenschaften dentalkeramischer Massen sind von beiden Phasen abhängig. Durch Auflockerungen im  $\text{SiO}_2$ -Grundgerüst, das den Glasanteil darstellt, werden die mechanischen Parameter geschwächt, durch den kristallinen Anteil werden sie verstärkt. Insgesamt ist die gebrannte Keramik bei hoher Härte und Druckfestigkeit zwar elastisch deformierbar, nicht aber plastisch verformbar und daher spröde und nur gering biege-, scher- und zugfest. Diese im Gegensatz zu Metallen hohe Sprödigkeit und Bruchempfindlichkeit gilt als Schwachpunkt der keramischen Werkstoffe [71, 209]. Sie sind in den kovalent-ionischen Mischbindungen der Keramik begründet, die im Vergleich zu der zwar kovalenten, aber nicht gerichteten metallischen Bindung keine plastische Verformung bei Gebrauchstemperatur zulassen [180, 209]. Dies führt auch dazu, dass Keramik sehr empfindlich auf winzige Fehler in ihrem Gefüge reagiert, die Ausgangspunkte für Risse darstellen, denn es gibt nicht wie bei Metallen die Möglichkeit, durch Verformung das Risswachstum zu stoppen. Durch einwirkende Zug-, Biege- und Scherkräfte werden kleine Risse noch verstärkt. Durch Druckspannungen werden die Risse verschlossen, was die hohe Druckfestigkeit der Keramik erklärt. Die starken, gesättigten Atombindungen der Keramik, die bezüglich der mechanischen Eigenschaften Nachteile bringen, sind aber auch für die Biokompatibilität und Mundbeständigkeit verantwortlich, denn sie führen zu großer chemischer Stabilität, Unlöslichkeit und Abrasionsfestigkeit. Die Undurchlässigkeit der Oberfläche erhöht die chemische Trägheit [71].

Keramiken werden anhand ihrer chemischen Zusammensetzung in zwei große Gruppen eingeteilt: Einerseits die sogenannten Silikatkeramiken, die mehrphasig sind und einen hohen Glasanteil besitzen, und andererseits die Oxidkeramiken, die zu über 90% aus einphasigen und ein-komponentigen Metalloxiden bestehen und höchstens einen geringen Anteil an Glasphase aufweisen. In die Gruppe der Silikatkeramiken fallen die klassischen Feldspatkeramiken, zu denen die heute gebräuchlichen Verblendkeramiken zählen, und die Glaskeramiken, die eine neuere Generation von Silikatkeramiken darstellen, bei denen eine amorphe Struktur durch einen kontrollierten Prozess teilweise auskristallisiert wird. Dadurch wird der Anteil der Glasmatrix zu Gunsten von kristallinen Anteilen reduziert und die Keramik stabilisiert, da die mittlere Weg-

länge entstehender Risse verlängert wird. In der Gruppe der Oxidkeramiken unterscheidet man glasinfiltierte Oxidkeramik, bei der es sich um mit Glas infiltriertes, angesintertes Aluminiumoxidpulver handelt, und polykristalline Oxidkeramik, wie die hochfesten Keramiken [180].

### 2.3.2.2 IPS Empress®2 – eine Glaskeramik

IPS Empress®2 lässt sich nach der oben beschriebenen Einteilung in die Kategorie Glaskeramik einordnen. Sie ist der Nachfolger von IPS Empress®, mit der seit 1990 ästhetisch hochwertige vollkeramische Restaurationen hergestellt werden können [110, 252]. Allerdings hat die zunächst verwendete Glaskeramik IPS Empress® lediglich die Herstellung von Veneers, Inlays, Onlays sowie Front- und Seitenzahnkronen erlaubt, da ihre Biegefestigkeit unter 200 MPa liegt und somit mit diesem Material keine Brückenkonstruktionen möglich sind. Die hochfeste IPS Empress®2 Schichttechnik-Keramik ermöglicht hingegen auch die Herstellung von vollkeramischen dreigliedrigen Brücken im Frontzahn- und Prämolarenbereich bis maximal zum zweiten Prämolaren als endständigem Pfeiler und ist weiterhin für die Anfertigung vollkeramischer Einzelkronen im gesamten Zahnbogenbereich indiziert [110, 252, 257].

IPS Empress®2 besteht aus zwei unterschiedlichen Glaskeramiken, einer Gerüst- und einer Schicht-Glaskeramik [252, 257]. Der Gerüstwerkstoff des IPS Empress®2-Systems ist die hochfeste Komponente des Materialsystems. Die Gerüstkeramik ist eine Lithiumdisilikat-Glaskeramik, deren chemische Basis das  $\text{SiO}_2$  -  $\text{Li}_2\text{O}$  System darstellt: Bei Standard-Zusammensetzung besteht ein Rohling aus 57–80 Gew.%  $\text{SiO}_2$  und 11–19 Gew.%  $\text{Li}_2\text{O}$ , zusätzlich sind in geringen Mengen  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{La}_2\text{O}_3$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{MgO}$  sowie  $\text{ZnO}$  enthalten [252]. Bei dem Lithiumdisilikat-Kristall handelt es sich um ein Schichtsilikat, in dem eine sehr enge Vernetzung der  $\text{SiO}_4$ -Tetraeder vorliegt [257]. Die Lithiumdisilikat-Glaskeramik wird mit Sinter-Glaskeramiken verblendet. Die Sinter-Glaskeramiken sind in speziellen Werkstoffvarianten als Dentin-, Schneide-, Impuls-, Transpa- und Effekt-Massen verfügbar. Sie setzen sich aus 45–70 Gew.%  $\text{SiO}_2$ , 5–22 Gew.%  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 4–13 Gew.%  $\text{Na}_2\text{O}$ , 1–11 Gew.%  $\text{CaO}$ , 3–9 Gew.%  $\text{K}_2\text{O}$ , 0,5–6,5 Gew.%  $\text{P}_2\text{O}_5$  und 0,1–2,5 Gew.% Fluor zusammen. Die kristalline Phase dieser Verblendkeramik besteht ausschließlich aus Apatit-Kristallen (Fluorapatit) [252].

IPS Empress®2 besitzt im Vergleich zu seinem Vorgänger IPS Empress eine doppelt so hohe Risszähigkeit sowie eine deutlich höhere Biegefestigkeit und Bruchzähigkeit von 350 – 430 MPa bzw.  $3,2 \text{ MPa m}^{0,5}$ , was auf den höheren Volumenanteil der kristallinen Phase [252, 257] und die Eigenschaft der Kristalle, mechanisches Versagen durch Verhindern bzw. Abbremsen einer Rissausbildung zu vermeiden, zurückzuführen ist [255]. IPS Empress®2 verfügt zudem über geringe Antagonistenabrasion [252] und verbesserte optische Eigenschaften wie Transluzenz, Helligkeit und Lichtstreuung der Schichtmasse [257]. Verantwortlich für die hohe Transluzenz

des Materials ist die optische Kompatibilität zwischen Glasmatrix und den Lithiumdisilikat-Kristallen, was als Vorteil gegenüber opak erscheinenden Hartkerngerüsten von Oxidkeramiken gewertet werden kann [255].

### 2.3.3 Zahnärztliche Polymere

#### 2.3.3.1 Allgemeines

Für alle Kunststoffe gilt, dass es sich um hochmolekulare Verbindungen handelt, die durch Synthese aus Monomeren hergestellt werden. Diese niedermolekularen Substanzen werden durch Kettenreaktionen wie Polymerisation, -kondensation oder -addition, die von Licht oder Chemikalien ausgelöst werden, zu Polymeren mit unterschiedlichem Molekulargewicht verknüpft [113, 116]. Das entstandene Polymer schließt als Matrix weitere Bestandteile wie Füllstoffe, Pigmente und Additive ein [162]. Die im Makromolekül vorliegende Verknüpfungsart der Monomere ist ein Kriterium zur Einteilung zahnärztlicher Kunststoffe; so unterscheidet man z. B. Polycarbonate mit Ester-Bindung, Polysiloxane mit Siloxan-Bindung und Polymere mit C-C-Bindung wie Polymethacrylate oder Polyvinylchlorid [116]. Polysiloxane und Polymethacrylate machen den größten Teil der verwendeten Kunststoffe aus, wobei erstere in der Zahnheilkunde im Wesentlichen als Abformwerkstoff eingesetzt werden, während vor allem Polymethacrylate bei der Herstellung verschiedenster zahnärztlicher Restaurationen Verwendung finden [113, 116], z. B. als Prothesen-, Unterfütterungs-, Befestigungs-, Versiegelungs-, Füllungs- oder Verblendkunststoff. Durch dieses breite Indikationsspektrum haben Kunststoffe, insbesondere solche auf Methacrylatbasis, eine große Bedeutung in der Zahnmedizin erlangt [116].

Es gibt eine Vielzahl an Monomeren, die eine Methacrylgruppe tragen, jedoch unterscheiden sie sich durch die Anzahl funktioneller Gruppen, ihre molare Masse und Hydrophobizität. Demzufolge sind auch die Eigenschaften des Polymers wesentlich von der Art des verwendeten Monomers abhängig. Aus monofunktionellen Methacrylaten können nur Fadenmoleküle entstehen wie sie z. B. in Thermoplasten zu finden sind, während höherfunktionelle Monomere die Entstehung von dreidimensionalen Netzwerken ermöglichen, aus denen Elasto- und Duromere aufgebaut sind. Die Größe der Monomere beeinflusst wesentlich die Polymerisationsschrumpfung, die umso geringer ausfällt, je höher die molare Masse ist. Das Vorhandensein hydrophiler Gruppen steigert die Wasserlöslichkeit und Wasseraufnahme eines Kunststoffs [116, 162]. Füllstoffe, Pigmente und Additive verleihen dem jeweiligen Material seine charakteristischen Merkmale wie beispielsweise hohe Festigkeit, geringen Abrieb, Farbe oder Stabilität gegenüber Alterungsprozessen [100]. Füllstoffe können organische und anorganische Materialien sein und beeinflussen vor allem Abrasionsstabilität, Transparenz, Festigkeit, Aushärtungsschrumpfung, chemische Beständigkeit und Wasserlöslichkeit. Organische Füllkörper sind Perl- oder Split-



terpolymerisate, die aus Monomer hergestellt werden; bei anorganischen Füllkörpern handelt es sich um feinstteiliges Siliziumdioxid, Bariumaluminiumborosilikatgläser oder Yttriumfluorid. Damit sich Matrix und Füllkörper, die im Fall der anorganischen Füllkörper chemisch vollständig verschiedene Phasen darstellen, zu einem einheitlichen Werkstoff verbinden lassen, muss die Füllstoffoberfläche silanisiert werden, um ihre Hydrophobizität zu steigern und sie somit der Polymermatrix anzupassen [99, 116, 162]. Pigmente wie Eisenoxid, Titandioxid und Aluminiumoxid sorgen für Farbe und Transparenz bzw. Opazität. Als Additive werden Weichmacher und Stabilisatoren, die die Lagerungsbeständigkeit erhöhen und Alterungsprozesse verhindern, eingesetzt. Insgesamt betrachtet werden die wichtigen physikalischen Eigenschaften wie Festigkeit, Abriebbeständigkeit, Aushärteschumpfung und Härte durch die Art des Matrixkunststoffes sowie durch die verwendeten Füllstoffe bestimmt. Je höher Füllstoffgehalt und molare Masse der Monomere sind, umso mehr sinkt die Abbindeschumpfung; mit zunehmendem Vernetzungsgrad und Gehalt an anorganischen Füllkörpern nehmen Härte und Festigkeit zu. Die Abriebfestigkeit wird wesentlich vom Zusammenspiel von Matrix und Füllkörpern bestimmt [116].

### 2.3.3.2 Sinfony™ – ein Verblendkunststoff

Verblendkunststoffe werden zum zahnfarbenen Verblenden von metallischen Kronen- oder Brückengerüsten verwendet. Sie lassen sich in heiß- und kalthärtende Pulver-/Flüssigkeits-Systeme, heißhärtende Einkomponentensysteme und lichthärtende Einkomponenten-Systeme in Pastenform unterteilen. Dabei stellen die lichthärtenden Materialien die modernste Variante dar. Sie bestehen aus Dimethacrylatmonomeren, Füllstoffen und Pigmenten und enthalten Campherchinon als Photoinitiator für die Polymerisation mit Licht. Diese erfolgt bei Wellenlängen zwischen 350 und 500 nm in 5 bis 25 Minuten.

Aufgrund ihrer Zusammensetzung kann man moderne Verblendkunststoffe auch den Kompositen zuordnen [116]. Dieser an sich allgemeine Begriff, der oft als Synonym für Füllungskunststoffe verwendet wird, beschreibt Kunststoffe, die wie in Kapitel 2.3.3.1 erwähnt, aus einer organischen und anorganischen Komponente bestehen, die durch ein Silan verbunden werden [99]. Komposite können nach verschiedenen Kriterien (Konsistenz, Füllkörper, Matrix [61]) eingeteilt werden; die am häufigsten angewandte Klassifikation wurde 1983 von Lutz *et al.* eingeführt und erfolgt „füllerorientiert“, da diese quantitativ stärkste Komponente der Komposite deren physikalisch-mechanischen und klinischen Eigenschaften wesentlich bestimmt. Lutz unterscheidet zwischen konventionellen, Mikrofüller- und Hybridkompositen [99]. Daneben sind nach Ernst bei der „füllerorientierten“ Einteilung nanooptimierte Hybridkomposite und Nanokomposite zu berücksichtigen [61].

Die konventionellen Komposite enthalten Makrofüller, bei denen es sich um rein anorganische,

splitterförmige Partikel aus Quarz, Glas oder Keramik in einem Größenbereich zwischen 0,1 und 100  $\mu\text{m}$  handelt. Der erreichte Füllstoffgehalt liegt bei circa 75 Gew.%. Da diese Art von Komposit einige ungünstige Eigenschaften wie mangelnde Ästhetik, schlechte Polierbarkeit und erhöhte Abrasion aufweist, wurden Mikrofüllerkomposite entwickelt, wobei man bei diesen zwischen homogenen und inhomogenen Kunststoffen unterscheidet.

Mikrofüller sind hochdisperse Kieselsäuren (feinstteiliges  $\text{SiO}_2$ ) in Gestalt kugelförmiger Partikel mit einer Größe unter einem Mikrometer. Solange ein Komposit nur Mikrofüller enthält, handelt es sich um ein homogenes Mikrofüllerkomposit, das allerdings aufgrund der großen spezifischen Oberfläche der Mikrofüller nur einen Füllstoffgehalt von circa 50% erreicht und somit eine starke Polymerisationsschrumpfung aufweist. Um diese zu reduzieren und gleichzeitig die mechanische Belastbarkeit des Werkstoffs zu erhöhen, wurden inhomogene Mikrofüllerkomposite eingeführt. Diese enthalten neben den Mikrofüllern auch splitter- oder kugelförmige Vorpolymerisate mit einer Größe zwischen ein und 200  $\mu\text{m}$ . Allerdings kommt es an ihrer Grenzfläche mit der Matrix zu Rissen während der Polymerisation und unter Kaubelastung und somit zu einer verringerten Verschleißfestigkeit im Seitenzahnbereich [99, 100].

Durch Kombination von Mikro- und Makrofüllern erhält man die Hybridkomposite, die die positiven Eigenschaften beider Systeme verbinden. Einerseits verfügen sie über gute physikalische Eigenschaften, geringe Polymerisationschrumpfung und Röntgenopazität wie die konventionellen Komposite, andererseits ermöglichen die enthaltenen Mikrofüller abriebbeständige, sehr gut polierbare und ästhetisch zufriedenstellende Restaurationen [100]. Hybridkomposite weisen einen Füllkörpergehalt von 85 Gew.% auf, wobei 85 bis 90% der Füllkörper Makro- und 10 bis 15% Mikrofüller sind. Je nach mittlerer Teilchengröße kann man die Hybridkomposite weiter in vier Typen bzw. in Hybridkomposite (mittlere Partikelgröße  $< 10 \mu\text{m}$ ), Feinpartikelhybridkomposite (mittlere Partikelgröße  $< 5 \mu\text{m}$ ), Feinstpartikelhybridkomposite (mittlere Partikelgröße  $< 3 \mu\text{m}$ ) und Submikrometerhybridkomposite (mittlere Partikelgröße  $< 1 \mu\text{m}$ ) unterscheiden [100]. Durch Integration von Nanopartikeln (mittlere Partikelgröße  $< 100 \text{ nm}$ ) in ein konventionelles Hybridkomposit entstehen nanooptimierte Hybridkomposite.

Im Gegensatz dazu enthalten Nanokomposite ausschließlich kleinste  $\text{SiO}_2$ -Partikel im Nanometerbereich (2 – 75 nm), die entweder in Partikelgrößen von 2 – 20 nm in Kombination mit Zirkonoxidpartikeln zu Agglomeraten vereint worden sind oder in Größen von 5 – 75 nm als einzelne, freie Partikel die Hohlräume zwischen den Agglomeraten ausfüllen. Sie vereinen die ausgezeichnete Polierbarkeit und den persistierenden Glanz der Mikrokomposite mit der Stabilität und Universalität der Hybridkomposite [61].

Bei Sinfony<sup>TM</sup> handelt es sich um ein lichterhärtendes Feinstpartikelhybridkomposit zur Teil- oder Vollverblendung von festsitzendem und herausnehmbarem Zahnersatz aus Metallgerüsten, sowie zur Herstellung von Veneers, Inlays, Onlays und Vollkomposit-Einzelkronen. Der Hauptbestand-

teil der Füllkörper-Mischung in Sinfony™ ist ein spezielles ultrafeines Strontium-Aluminium-Borosilikatglas im Submikrometer-Bereich. Zudem enthält das Produkt pyrogene Kieselsäure. Das Sinfony™-System beinhaltet Opaquer-, Dentin- und Schneidmassen für die 16 VITAPAN-Classical-Farben und außerdem Intensiv-Opaquer, Opaque-Dentine, Transparent-Opal Massen, Magic-Farben und Verarbeitungszubehör [1, 2].

### 2.3.3.3 Palapress®Vario – ein Prothesenkunststoff

Prothesenkunststoffe können zwar auch aus chemischen Verbindungen wie Polycarbonaten oder Polyacetalen bestehen, überwiegend handelt es sich jedoch um Polymethylmethacrylate. Der Grund für ihre weite Verbreitung liegt in ihren sehr guten physikalischen und chemischen Eigenschaften, der einfachen Ver- und Bearbeitbarkeit und dem guten Verbund zu Kunststoffzähnen. Außerdem liefern sie durch gute Farbstabilität und Transparenz zufriedenstellende ästhetische Ergebnisse.

Bezüglich ihrer Zusammensetzung kann man Polymethylmethacrylate in lichthärtende Materialien und in Pulver-Flüssigkeits-Systeme, die ihrerseits in kalt- und heißhärtende Systeme differenziert werden, unterscheiden. Die Flüssigkeit der Zweikomponenten-Materialien besteht aus etwa 90% Methylmethacrylat, 8% Vernetzer und 2% Additiven, das Pulver aus 99% Polymethylmethacrylat und Pigmenten. Heißpolymerisate enthalten im Pulver zusätzlich Dibenzoylperoxid als Initiator; die kalthärtenden Autopolymerisate weisen in beiden Komponenten einen Initiator auf – Barbitursäure-Verbindungen im Pulver, Kupferionen in der Flüssigkeit. Die lichthärtenden Prothesenkunststoffe sind Einkomponenten-Materialien mit pastöser Konsistenz, die kein Methylmethacrylat, sondern hochmolekulare Dimethacrylate enthalten. Außerdem werden ähnlich wie bei einem Komposit verschiedene Füllstoffe, Pigmente und Additive zugemischt [116, 245].

Bei Palapress®Vario handelt es sich um ein kalthärtendes Zweikomponenten-Material, dessen Hauptkomponenten im Pulver ein Methylmethacrylat-Copolymer und in der Flüssigkeit Methylmethacrylat und Dimethacrylat sind. Es ist rosa eingefärbt oder farblos verfügbar und wird im Gießverfahren verarbeitet [102]. Palapress®Vario kommt bei der Herstellung von Modellgussprothesen mit gegenüberliegenden Sätteln, als Reparaturwerkstoff und zur Randgestaltung, indirekten Unterfütterung und Prothesenerweiterung zum Einsatz. Als weitere Vorteile von Palapress®Vario gibt der Hersteller hohe Passgenauigkeit, sehr gute Schleimhautverträglichkeit durch geringen Restmonomergehalt und farbliche Übereinstimmung von Total- und Teilprothesen sowie Reparaturen an [103].



# Kapitel 3

## Material und Methode

### 3.1 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, verschiedene zahnärztliche Werkstoffe hinsichtlich der Adhäsion der koaggregierenden Keime *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V (im Folgenden abgekürzt mit DL1 und T14V) *in vitro* zu untersuchen und zu analysieren, wodurch eventuell auftretende Unterschiede in der Adhäsion der beiden Keime an die verschiedenen Materialien begründet sein könnten. Zudem wurde untersucht welchen Einfluss die Rauigkeit einer Oberfläche und die Anwesenheit einer Pellikel auf die Biofilmbildung nehmen. Darüberhinaus sollte die gegenseitige Beeinflussung der Keime bei der Kolonisation der Prüfkörper beurteilt werden.

Zunächst wurden Vorversuche durchgeführt, die sich mit dem Wachstumsverhalten von DL1 und T14V beschäftigten. Schon hier deutete sich an, dass die ursprünglich für einen Teil der Hauptversuche geplante Ausführung unter dynamischen Bedingungen nur für T14V, nicht aber für DL1 möglich war, da sich von DL1 das für die dynamischen Versuchsbedingungen erforderliche Volumen an Bakteriensuspension nicht herstellen ließ. Da somit Versuche zur Biofilmbildung mit DL1 bzw. einer Mischung aus DL1 und T14V nicht unter dynamischen Bedingungen durchgeführt werden konnten, wurden alle Hauptversuche unter semistatischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Sie wurden in mehrere Versuchsreihen unterteilt, in denen verschiedene Faktoren (Inkubationszeit, Rauigkeit, Material/Oberflächenenergie, Pellikel) hinsichtlich ihrer Relevanz für die Adhäsion des entsprechenden Keims mittels fluorometrischer Messung und anschließender rasterelektronenmikroskopischer Auswertung untersucht wurden.

## 3.2 Untersuchte Werkstoffe und Speichellösungen

### 3.2.1 Werkstoffe und Prüfkörper

Es wurde je ein Vertreter der Nichtedelmetalllegierungen, der Keramiken, der Verblend- und der Prothesenkunststoffe untersucht. Im Einzelnen handelte es sich um

- die Co-Cr-Legierung Girobond<sup>®</sup>NB (Amann Girrbach, Pforzheim, D) (kurz: Girobond),
- die Glaskeramik Empress<sup>®</sup>2 (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) (kurz: Empress),
- den Verblendkunststoff Sinfony<sup>™</sup> (3M Espe, Seefeld, D) (kurz: Sinfony) und
- den Prothesenkunststoff Palapress<sup>®</sup>Vario (Heraeus Kulzer, Hanau, D) (kurz: Palapress).

Eine detaillierte Beschreibung dieser Werkstoffe findet sich in Kapitel 2.3.

Girobond, Empress und Sinfony wurden in Versuchsreihe ③ (siehe Kap. 3.3.4.1) der Hauptversuche verwendet. Palapress wurde bei Versuchsreihe ① und ② verwendet, wobei Prüfkörper aus Glas (siehe Kap. 3.2.1.1) als Referenzmaterial dienten.

#### 3.2.1.1 Herstellung

Die Prüfkörper aus **Girobond** waren bereits für eine frühere Untersuchung hergestellt worden. Genaue Angaben zum dabei angewandten Lost-Wax-Verfahren finden sich bei Hahnel [83]. Die vorhandenen Prüfkörper wurden gemäß der in Kapitel 3.2.1.5 beschriebenen Vorgehensweise bearbeitet und anschließend wiederverwendet.

Auch die Prüfkörper aus **Empress** waren bereits vorhanden und wurden nach entsprechender Behandlung (siehe Kap. 3.2.1.5) wiederverwendet. Für eine detaillierte Beschreibung ihrer Herstellung sei ebenfalls auf Hahnel [83] verwiesen.

Zur Herstellung von Prüfkörpern aus **Sinfony** wurden zunächst identische Schablonen in Form von herkömmlichen Unterlegscheiben vorbereitet, indem sie mit Vaseline isoliert und auf einer mit einer Acetatfolie (Acetate Foil for Microtest Wellplates, Sarstedt, Sarstedt Inc., Newton NC, USA) belegten Glasplatte ausgelegt wurden. Dieses Vorgehen garantiert gleichmäßig große Prüfkörper mit einer standardisierten Oberfläche. Anschließend wurden aus dem Dispenser gleiche Mengen des fließenden Materials in die Aussparungen der Metallplatten gefüllt. Die Aushärtung erfolgte im Polymerisationsgerät Unilux AC (Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts., D). Die dabei entstehende Sauerstoffinhibitionsschicht wurde durch eine Polymerisation unter Vakuum im 3M Espe Visio Beta vario Lichtpolymerisationsgerät (3M Espe, Seefeld, D) für 15 Minuten entfernt.

Zur Herstellung von Prüfkörpern aus **Palapress** wurden die eben beschriebenen Schablonen



Abbildung 3.1: Poliermaschine



Abbildung 3.2: Perthometer

in gleicher Weise vorbereitet. Anschließend wurde der Kunststoff angeteigt, indem Pulver und Flüssigkeit nach Herstellerangaben im Verhältnis 5 mg/3 ml gemischt wurden. In fließfähiger Konsistenz wurde der Kunststoff gleichmäßig hoch in die runden Schablonen eingefüllt. Sobald der Kunststoff eine zähe Konsistenz aufwies, wurden die Prüfkörper bei 50 °C und 2 bar für 15 Minuten im Drucktopf polymerisiert.

Bei den Prüfkörper aus Glas, die in manchen Versuchsreihen als Referenzmaterial dienten, handelte es sich um standardisierte runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 10 mm (Marienfeld, D), die ohne weitere Bearbeitung verwendet wurden.

### 3.2.1.2 Nachbearbeitung

Die selbst hergestellten Prüfkörper erforderten nach ihrer Anfertigung eine Nachbearbeitung, um ihre Oberflächen so zu gestalten, wie sie auch in der Mundhöhle nach Bearbeitung durch Zahntechniker bzw. Zahnarzt vorliegen. Aus diesem Grund wurden die Prüfkörper zunächst mit Hartmetallfräsen entgratet, jedoch so, dass der Durchmesser der Prüfkörper dabei nicht verändert wurde. Anschließend wurde die Prüfkörperoberfläche entweder unter Einsatz von Schleifpapier der Körnung 500 (bei einigen Prüfkörpern aus Palapress) oder der Körnung 1000 und 4000 sowie permanenter Wasserkühlung mit der Poliermaschine Motopol 8 (Buehler GmbH, Düsseldorf, D) (siehe Abb. 3.1) geglättet.

### 3.2.1.3 Messung der Rauigkeit mittels Profilometrie

Im Anschluss an die Politur wurde die Rauigkeit der Prüfkörperoberflächen mit einem Rauigkeitsmessgerät (Perthometer S6P, Feinprüf-Perthen, Göttingen, D) (siehe Abb. 3.2) mittels

Profilometrie im Tastschlittenprinzip überprüft (Vorschub: 1,75 mm; „cut off level“: 0,25), wobei von jeder hergestellten Charge randomisiert 33% der Prüfkörper an je drei Stellen (zweimal marginal, einmal zentral) vermessen wurden. Prinzipiell kann die Charakterisierung der Oberflächenrauigkeit anhand verschiedener Kenngrößen ( $R_a$ ,  $R_z$ , u.a.; Details siehe Kap. 5.1.2) erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Mittenrauwert  $R_a$  erfasst, der dem arithmetischen Mittelwert der Beträge aller Profilwerte der gesamten Messstrecke entspricht [239, 246].

Wenn der Mittenrauwert  $R_a$  im Mittel  $0,08\text{ }\mu\text{m}$  nicht überschritt, konnten die Prüfkörper verwendet werden, ansonsten war eine erneute Politur aller Prüfkörper erforderlich. Lediglich einige Prüfkörper aus Palapress, die für Versuchsreihen mit dem Ziel, den Einfluss unterschiedlicher Rauigkeiten zu ermitteln, vorgesehen waren, sollten bestimmungsgemäß höhere Werte von mindestens  $0,4\text{ }\mu\text{m}$  bzw.  $0,6\text{ }\mu\text{m}$  aufweisen.

#### 3.2.1.4 Vorbereitung

Die weitere Vorbereitung der Prüfkörper für die Durchführung der Versuche zur Biofilmbildung bestand zunächst in ihrer Reinigung. Dazu wurden die Prüfkörper für eine Minute in 70%-igem Ethanol eingelegt. Nach dem Abgießen des Ethanol wurden die Prüfkörper zweimal mit Aqua dest. gewaschen; anschließend wurden sie unter sterilen Bedingungen in Wells eingebracht, je mit 1 ml sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und für sieben Tage im Kühlschrank gelagert.

#### 3.2.1.5 Wiederverwendung

Prüfkörper aus Girobond und Empress wurden zur erneuten Verwendung mit Schleifpapier der Körnung 4000 bzw. 1000 und 4000 bearbeitet, anschließend mit Universalpolierpaste (Ivoclar Vivadent, Schaan, FL) und Ziegenhaarbürstchen aufpoliert, im Ultraschallbad von den Pasterückständen gereinigt und abgedampft und hinsichtlich des Mittenrauwerths  $R_a$  kontrolliert. Prüfkörper aus Palapress wurden einer 15-minütigen Reinigung in 70%-igem Ethanol unterzogen, der im Anschluss mit Aqua dest. entfernt wurde. Die Politur erfolgte zunächst mit gröberer Körnung, um die oberflächliche Schicht mit eventuell eingedrungenen Bakterien zu entfernen; anschließend wurde mit verschiedenen Schleifpapieren bis zur Körnung 4000 gearbeitet und der Mittenrauwert  $R_a$  bestimmt. Eine Wiederverwendung von Prüfkörpern aus Sinfony war nicht erforderlich, da die vorhandene Stückzahl für die Durchführung der Versuche ausreichend war. Die Referenzen aus Glas wurden ebenfalls nur einmal eingesetzt.

### 3.2.2 Speichellösungen

Um die Bildung der Pelikel *in vitro* zu simulieren, wurde die Hälfte der Prüfkörper nach der Wasserlagerung nicht direkt mit den Bakteriensuspensionen, sondern zunächst mit natürli-



chem Speichel inkubiert; die andere Hälfte der Prüfkörper wurde mit einem Kontrollmedium inkubiert. Für die ursprünglich geplante Durchführung der Versuche unter dynamischen Bedingungen war kein natürlicher Speichel gesammelt worden; stattdessen war künstlicher Speichel hergestellt worden, da im an der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik existierenden Versuchsaufbau zur Simulation der Biofilmbildung unter dynamischen Bedingungen ein erhebliches Volumen (1,5 Liter) an Speichel zur Erzeugung einer *in vitro* generierten Pellikel erforderlich ist. Obwohl der künstliche Speichel nicht zur Anwendung kam, wird seine Herstellung ebenfalls kurz beschrieben.

### 3.2.2.1 Natürlicher Speichel

Der natürliche Speichel stammte von einer Person (weiblich, 22 Jahre, gute Mundhygiene, keine konservierende oder prothetische Versorgung, keine (initial)kariösen Läsionen oder parodontale Erkrankungen); der Speichel wurde immer zur gleichen Tageszeit (vormittags) circa zwei Stunden nach dem Zähneputzen ohne Einsatz den Speichelfluss stimulierender Substanzen durch Expektorat gesammelt und zunächst im Kühlschrank aufbewahrt.

Anschließend wurde der gesammelte Speichel mit Einmalfiltrationsgeräten (Vacuflo PV050/2, Schleicher & Schüll Microscience GmbH, Dassel, D) der Porengröße 0,45 µm und mit Milliporefiltern (Steritop™ 0,22 µm, GP MilliporeExpress® Plus Membrane, Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA) filtriert und bis zur Verwendung tiefgefroren.

### 3.2.2.2 Künstlicher Speichel

0,85 g Muzin (Mucine from porcine stomach Typ III, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) und 1 g Amylase ( $\alpha$ -Amylase from hog pancreas 53,2 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) wurden eingewogen, in 1000 ml PBS gelöst und mit 500 µl Lysozym (Lysozyme from hen egg white, Fluka Biochemika, Buchs, CH) und 1 ml Albumin (Albumin Bovine, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt. Die Zusammensetzung orientierte sich an den Ergebnissen einer Untersuchung von Hahnel zur Eignung von Proteinmischungen als Speichelersatz für die bakterielle *in vitro* Adhäsion [83]. Die entstandene Lösung wurde anschließend wie für natürlichen Speichel beschrieben filtriert und tiefgefroren.

### 3.2.2.3 PBS („Phosphate Buffered Saline“)

Als Kontrolle wurde in allen Versuchen PBS (Phosphate Buffered Saline) verwendet. Diese Substanz mit einem pH zwischen 7,2 und 7,4 entsteht durch Lösung von (Di)kaliumhydrogenphosphat und Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, D) in destilliertem H<sub>2</sub>O und wird zur Suspension oder Verdünnung von wenig anspruchsvollen Mikroorganismen eingesetzt [16].

### 3.3 Versuchsdurchführung

#### 3.3.1 Überblick

Im Rahmen der **Vorversuche** wurden *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens und ihrer gegenseitigen Beeinflussung untersucht. Zu diesem Zweck wurden Wachstumskurven aufgestellt und nach dem Ausplattieren von normierten Bakterienkulturen eine Zellzahlbestimmung vorgenommen. Dabei wurde sowohl mit Einzelkulturen von DL1 und T14V als auch mit Kokulturen der beiden Keime gearbeitet, wobei die Untersuchung der Kokulturen Aufschluss darüber geben sollte, in welcher Weise sich die beiden Keime DL1 und T14V gegenseitig beeinflussen. Die Kokulturen wurden dazu auf drei verschiedene Weisen hergestellt. Diese verschiedenen Vorgehensweisen wurden gewählt, um herauszufinden, ob es in Abhängigkeit der Wachstumsphase, in der sich die Zellen zu dem Zeitpunkt befinden, zu dem sie für ein gemeinsames Wachstum zusammengeführt werden, und in Abhängigkeit von den zusammengeführten Mengen an Zellen zu quali- und quantitativen Unterschieden des Bakterienwachstums kommt.

Die **Hauptversuche** wurden semistatisch in Form von drei Versuchsreihen durchgeführt. In den ersten beiden Versuchsreihen wurden verschiedene Inkubationszeiten und Rauigkeiten auf ihren Einfluss bezüglich der bakteriellen Adhäsion an Prüfkörper aus Palapress und Glas untersucht. In der dritten Versuchsreihe wurde die Adhäsion der Testkeime an die Materialien Girobond, Empress und Sinfony verglichen. Um auch den Einfluss der freien Oberflächenenergie der Testmaterialien auf das Adhäsionsverhalten beurteilen zu können, wurden zudem Kontaktwinkelmessungen durchgeführt und die freien Oberflächenenergien bestimmt. Weiterhin sollte bei allen Versuchsreihen die Bedeutung der Speichelpellikel für die Adhäsion der Testkeime bewertet werden, indem bei der Hälfte der Prüfkörper die Bildung einer Pellikelschicht vor Inkubation mit Bakterien simuliert wurde. Im Rahmen der Hauptversuche wurde – anders als bei den Vorversuchen – nur mit Einzelkulturen gearbeitet. Die Inkubation der Prüfkörper mit Einzelkulturen (nur DL1, nur T14V) ermöglichte einen Vergleich beider Keime hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens. Indem die Prüfkörper zudem sequentiell mit Bakterien aus Einzelkulturen versetzt wurden, konnte untersucht werden, ob es zur Ausbildung von Koaggregaten kam.

#### 3.3.2 Bakterien

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte für Vor- und Hauptversuche teilweise unterschiedlich, da nur in den Vorversuchen auch Kokulturen untersucht wurden. Im folgenden sind die verschiedenen Vorgehensweisen beschrieben.

### 3.3.2.1 Medium

Für Flüssigkulturen der beiden Keime stellt eine Herz-Hirn-Boullion ein geeignetes Nährmedium dar [68,176]. Zum Ansetzen der Lösung wurden 37 g pulverförmige Herz-Hirn-Boullion (Merck, Darmstadt, D) mit 1000 ml Aqua Dest. versetzt und der pH-Wert durch Zugabe von HCl bzw. NaOH auf 7,4 eingestellt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden an dieser Stelle noch 15 g Agar hinzugefügt, der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Die abgefüllte Nährlösung wurde anschließend autoklaviert.

### 3.3.2.2 Kultivierung

Ausgehend von Gefrierkulturen von DL1 und T14V, die von Paul E. Kolenbrander (National Institute of Dental and Craniofacial Research; Bethesda, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt worden waren, wurden Wochenkulturen gezüchtet, indem 10 µl der Gefrierkulturen in Kulturröhrchen, die 10 ml Nährmedium enthielten, überimpft und diese anschließend für 15 (DL1) bzw. 21 (T14V) Stunden im Thermoschüttelgerät (OrbitalShaker, Thermo Forma, Marietta, USA) (siehe Abb. 3.3) bei 37 °C inkubiert wurden. Nach dem so erfolgten Ansetzen einer Wochenkultur wurde diese am Folgetag und anschließend wöchentlich überimpft. Zur Durchführung der Versuche wurden bereits zwei Tage zuvor je 50 µl der als Wochenkultur gewachsenen Bakteriensuspension in Erlenmeyerkolben mit 50 ml Herz-Hirn-Boullion eingebracht und inkubiert (15 (DL1) bzw. 21 (T14V) Stunden). Am nächsten Tag wurden die eigentlichen Versuchskulturen angesetzt, indem je 50 µl der seit dem Vortag gewachsenen Kultur in Erlenmeyerkolben mit 50 ml Nährmedium überimpft und anschließend inkubiert wurden.

#### 1. Vorversuche mit Einzelkulturen:

Zum Aufstellen der **Wachstumskurven** erstreckte sich die Inkubation der Versuchskulturen über vier (DL1) bzw. fünf (T14V) Tage, während deren die Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich ihrer optischen Dichte untersucht wurden (siehe Kap. 3.3.3.1).

Für die **Zellzahlbestimmung** wurde die Inkubation der Versuchskulturen nach 10 (DL1) bzw. 20 (T14V) Stunden beendet, ein Zellpellet abzentrifugiert (2200 r/min, 18 °C, 5 min; Hettich Rotixa P, D bzw. 2248 r/min, 18 °C, 5 min; Labofuge 400R, Heraeus, D), zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS resuspendiert. Um normierte Bakteriensuspensionen zu erhalten, wurde ihre optische Dichte unter Einsatz eines Photometers (Genesys 10-S, Thermo Spectronic, Rochester, USA) (siehe Abb. 3.4) nach Kalibrieren des Geräts gegen eine mit PBS gefüllte Küvette auf 0,3 bei einer Wellenlänge von 540 nm eingestellt.

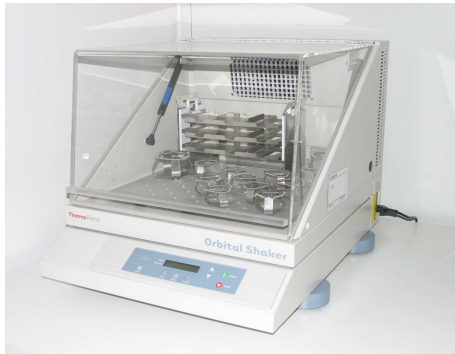


Abbildung 3.3: Thermoschüttelgerät



Abbildung 3.4: Photometer

2. Vorversuche mit Kokulturen: Die Versuchskulturen wurden zeitversetzt angeimpft und im Weiteren verschiedene Inkubationskonstellationen getestet:

Beim Aufstellen der gemeinsamen **Wachstumskurve** wurde die Versuchskultur von T14V acht Stunden früher angesetzt als diejenige von DL1 und zu einem Zeitpunkt, zu dem zu erwarten war, dass sich beide Keime am Beginn ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden (zwei Stunden nach dem Animpfen bei DL1, zehn Stunden nach dem Animpfen bei T14V) aus den Versuchskulturen jeweils gleiche Volumina der nicht auf eine bestimmte optische Dichte normierten Bakteriensuspensionen zusammengeführt und anschließend die Inkubation fortgesetzt.

Zur **Zellzahlbestimmung** wurde zunächst die Versuchskultur von T14V angesetzt und zehn Stunden später diejenige von DL1. Nach weiteren zehn Stunden Inkubation, nach denen zu erwarten war, dass sich beide Keime in der stationären Wachstumsphase befanden, wurden die Kulturen nicht zentrifugiert, sondern mit Nährmedium auf eine optische Dichte von 0,3 bei 540 nm eingestellt. Die so normierten Bakteriensuspensionen wurden nun dazu verwendet, erneut Versuchskulturen anzusetzen.

Bei einer ersten Variante wurden jeweils gleiche Volumina der Bakteriensuspensionen zusammengegeben und für 20 Stunden inkubiert.

Bei einer zweiten Variante wurden die neuen Versuchskulturen zunächst einzeln und um acht Stunden versetzt inkubiert. Zu einem Zeitpunkt, zu dem zu erwarten war, dass sich beide Keime am Beginn ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden (zwei Stunden nach dem Animpfen bei DL1, zehn Stunden nach dem Animpfen bei T14V) wurden jeweils gleiche Volumina miteinander vermischt und zwölf Stunden inkubiert.

Nach beendeter Inkubation wurde die Kulturen bei beiden Varianten wie unter 1. beschrieben zentrifugiert und normiert.

3. Hauptversuche: Die Versuchskulturen von DL1 und T14V wurden um zehn Stunden zeitversetzt angeimpft und nach beendeter Inkubation (20 Stunden T14V, 10 Stunden DL1) wie unter 1. beschrieben zentrifugiert und normiert.

Alle Kulturen wurden vor ihrer Verwendung lichtmikroskopisch (Mikroskop Standard 16, Zeiss, D; Objektiv Achromat 100/1,25 Oil) hinsichtlich der Vitalität der Bakterien untersucht.

### 3.3.3 Vorversuche

Durch das Aufstellen von Wachstumskurven und Zellzahlbestimmungen wurden die Bakterien näher hinsichtlich ihres Verhaltens charakterisiert.

#### 3.3.3.1 Wachstumskurven

Aus den Versuchskulturen, die entsprechend der in Kapitel 3.3.2.2 angeführten Vorgehensweise gezüchtet worden waren, wurden Proben des Volumens 1 ml zu verschiedenen Zeitpunkten, die sich über vier (DL1) bzw. fünf (T14V, DL1 und T14V) Tage erstreckten (0/ 2/ 5/ 6,5/ 7,5/ 9,5/ 14/ 16/ 19/ 22/ 24/ 28/ 46/ 68/ 72/ 76/ 92/ 94/ 96,5/ 97,5/ 99,5/ 100,5 Stunden nach Animpfen der Versuchskultur), entnommen und mit dem Photometer bezüglich ihrer optischen Dichte vermessen. Zudem wurde ein Ausstrich der Flüssigkultur lichtmikroskopisch (siehe Kap. 3.3.2.2) untersucht.

#### 3.3.3.2 Zellzahlbestimmung

Je ein Milliliter der Bakteriensuspensionen mit einer optischen Dichte von 0,3, die wie in Kapitel 3.3.2.2 beschrieben gewachsen waren, wurde mit PBS auf 1:10 bis 1:1.000.000 verdünnt. Von jeder der sechs Verdünnungen wurden je 50 µl auf einer Agarplatte ausplattiert und diese anschließend im Standinkubator (Heraeus Function Line, Heraeus, D) bei 37 °C für 96 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien ausgezählt und fotodokumentiert (Canon EOS D30, Canon Deutschland).

### 3.3.4 Hauptversuche

Dieser Abschnitt stellt dar, wie durch die Kombination der einzelnen Parameter der verschiedenen Variablen (**Pellikel**, **Material**, **Inkubationszeit**, **Rauigkeit**) unterschiedliche Versuchsszenarien gestaltet wurden, um die Variablen und Parameter bezüglich ihrer Bedeutung für die Adhäsion von DL1, T14V sowie DL1 und T14V beurteilen zu können. Außerdem werden der semistatische und der dynamische Versuchsaufbau beschrieben.

### 3.3.4.1 Parameter-Kombinationen und Versuchsreihen

Die folgenden Tabellen 3.1 bis 3.3 zeigen die Parameter-Kombinationen, die bei den verschiedenen Versuchsreihen untersucht wurden. Jede Zelle stellt ein Szenario dar.

	DL1		T14V		beide		
2,5							+
4							
24							
2,5							-
4							
24							
	P	G	P	G	P	G	

Tabelle 3.1: Versuchsreihe ①

Bei Versuchsreihe ① entstanden die Szenarien durch die Kombination aller Parameter der Variablen **Keim** (DL1, T14V, beide), **Pellikel** (mit +, ohne -), **Material** (Palapress P, Glas G) und **Zeit** ( $2\frac{1}{2}$ , 4, 24 Stunden).

	DL1	T14V	beide	
$P_g$				+
$P_r$				
G				
$P_g$				-
$P_r$				
G				

Tabelle 3.2: Versuchsreihe ②

Bei Versuchsreihe ② entstanden die Szenarien durch die Kombination aller Parameter der Variablen **Keim** (DL1, T14V, beide), **Pellikel** (mit +, ohne -) und **Rauigkeit/Material** (Palapress glatt  $P_g$ , Palapress rau  $P_r$ , Glas G).

	DL1	T14V	beide	
E				+
S				
G				
E				-
S				
G				

Tabelle 3.3: Versuchsreihe ③

Bei Versuchsreihe ③ entstanden die Szenarien durch die Kombination aller Parameter der Variablen **Keim** (DL1, T14V, beide), **Pellikel** (mit +, ohne -) und **Material** (Empress E, Sinfony S, Girobond G).

Tabelle 3.4 gibt einen Überblick darüber, welche Variablen und Parameter bei den einzelnen Versuchen in erster Linie untersucht wurden (rot markiert). Bei Versuchsreihe ② wurden

glatte Prüfkörper aus Palapress ( $R_a$  durchschnittlich  $0,07 \mu\text{m}$ ) zum einen mit Prüfkörpern aus Palapress mit einem Mittenrauwert  $R_a$  von  $0,42 \mu\text{m}$  und zum anderen mit Prüfkörpern aus Palapress mit einem Mittenrauwert  $R_a$  von  $0,65 \mu\text{m}$  verglichen.

Versuchsreihe	Keim	Zeit	Material	Pellikel
①	DL1/ T14V/ beide	2,5 h	Palapress/ Glas	+ / -
	DL1/ T14V/ beide	4 h	Palapress/ Glas	+ / -
	DL1/ T14V/ beide	24 h	Palapress/ Glas	+ / -
②	DL1/ T14V/ beide	2,5 h	Palapress (0,07/0,42)/ Glas	+ / -
	DL1/ T14V/ beide	2,5 h	Palapress (0,07/0,65)/ Glas	+ / -
③	DL1/ T14V/ beide	4 h	Empress Sinfony Girobond	+ / -
dynamische Versuchs- bedingungen	T14V	4 h	Empress Sinfony Girobond	-

Tabelle 3.4: Übersicht über die Hauptversuche

### 3.3.4.2 Biofilmbildung unter semistatischen Bedingungen

Am Tag vor der Versuchsdurchführung wurden für jede Parameter-Kombination, die im entsprechenden Versuch beurteilt werden sollte, 13 (zehn Proben, zwei Farb- und eine Nullkontrolle) der wassergelagerten Prüfkörper nach dem Trocknen mit Dubliersilikon in eine sterile 48er Well-Platte (48 Well Cell Culture Cluster, Corning Inc., Corning, NY 14831, USA) eingeklebt. Nachdem in jedes Well mit Dispenser (HandyStep, BRAND, D) und Eppendorf-Spritzen (Eppendorf, Hamburg, D) 1 ml steriles  $\text{H}_2\text{O}$  pipettiert worden war, wurden die Well-Platten bis zu ihrer weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Am Versuchstag wurde die Flüssigkeit mittels Wasserstrahlpumpe aus jedem Well abgesaugt und anschließend entweder 1 ml Speichel oder 1 ml PBS zupipettiert. Die Well-Platten wurden in lichtdichten Boxen, die mit feuchten Tüchern ausgelegt waren, für zwei Stunden im Schüttelinkubator (siehe Kap. 3.3.2.2) bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Wells mit Vakuumpumpe (KNF Neuberger LABOPORT, Freiburg, D) und angeschrägter Pipettenspitze abgesaugt, ohne dabei die Oberfläche der Prüfkörper zu berühren. Es folgte die Zugabe von 1 ml Bakteriensuspension mit der optischen Dichte von 0,3 bzw. im Fall der gemeinsamen Inkubation von DL1 und T14V die Zugabe von 0,5 ml der DL1-Suspension zu den zehn Probe-Wells. Zu den Farb- und Nullkontrollen wurde 1 ml PBS pipettiert. Die Well-Platten wurden erneut, wie



Abbildung 3.5: Fluorometer

beschrieben, inkubiert. Die Inkubationszeit betrug  $2\frac{1}{2}$ , 4 oder 24 Stunden bei Versuchsreihe ①,  $2\frac{1}{2}$  Stunden bei Versuchsreihe ② und 4 Stunden bei Versuchsreihe ③. Wenn eine gemeinsame Biofilmbildung von DL1 und T14V simuliert werden sollte, wurden nach der halben Inkubationszeit zusätzlich 0,5 ml der T14V-Suspension zugeben und dann die Inkubation fortgesetzt. Als diese beendet war, wurden die Bakteriensuspensionen abgesaugt und die Prüfkörper gewaschen, indem über ein Winkelgestell in jedes Well 1 ml PBS zugegeben und anschließend sofort wieder mit Vakuumpumpe und angeschrägter Pipettenspitze abgesaugt wurde. Dieses Vorgehen wurde einmal wiederholt. Im Anschluss wurden zu jedem Well 200  $\mu$ l PBS und – außer zur Nullkontrolle – 10  $\mu$ l CytoX-Violet™ (Cell Proliferation Cytotoxicity Assay Kit, Epi-gentek Group Inc., NY, USA) pipettiert und die Well-Platten für 2,5 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden aus jedem Well 180  $\mu$ l entnommen und in eine 96er Well-Platte (Nunc F96 MicroWell™ Plates, Thermo Fisher Scientific, Kamstrupvej, DK) überführt. Die Well-Platten wurden anschließend in ein automatisiertes Plattenlesegerät (FLUOstar OPTIMA, BMG LAB-TECH, Offenburg, D) (siehe Abb. 3.5) eingelegt und die relative Fluoreszenzintensität (Gain 1500, 1800 und 2000) bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen.

Dieser Messmethode liegt ein photometrisches Prinzip zugrunde, welches auf der Erfassung der durch Fluoreszenz entstehenden Lichtstrahlung beruht. Das Erregerlicht durchstrahlt die Probe, welche die fluoreszierende Substanz enthält. Diese verwandelt einen Teil des einfallenden Lichts der Wellenlänge  $\lambda$  in Fluoreszenzlicht einer grösseren Wellenlänge  $\lambda'$ . Das so erzeugte Licht kann mit einem Detektor gemessen werden. Die Strahlungsleistung des Fluoreszenzlichts ist im Bereich kleiner Mengen proportional zur Konzentration der fluoreszierenden Substanz [214].

Abbildung 3.6 gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau.



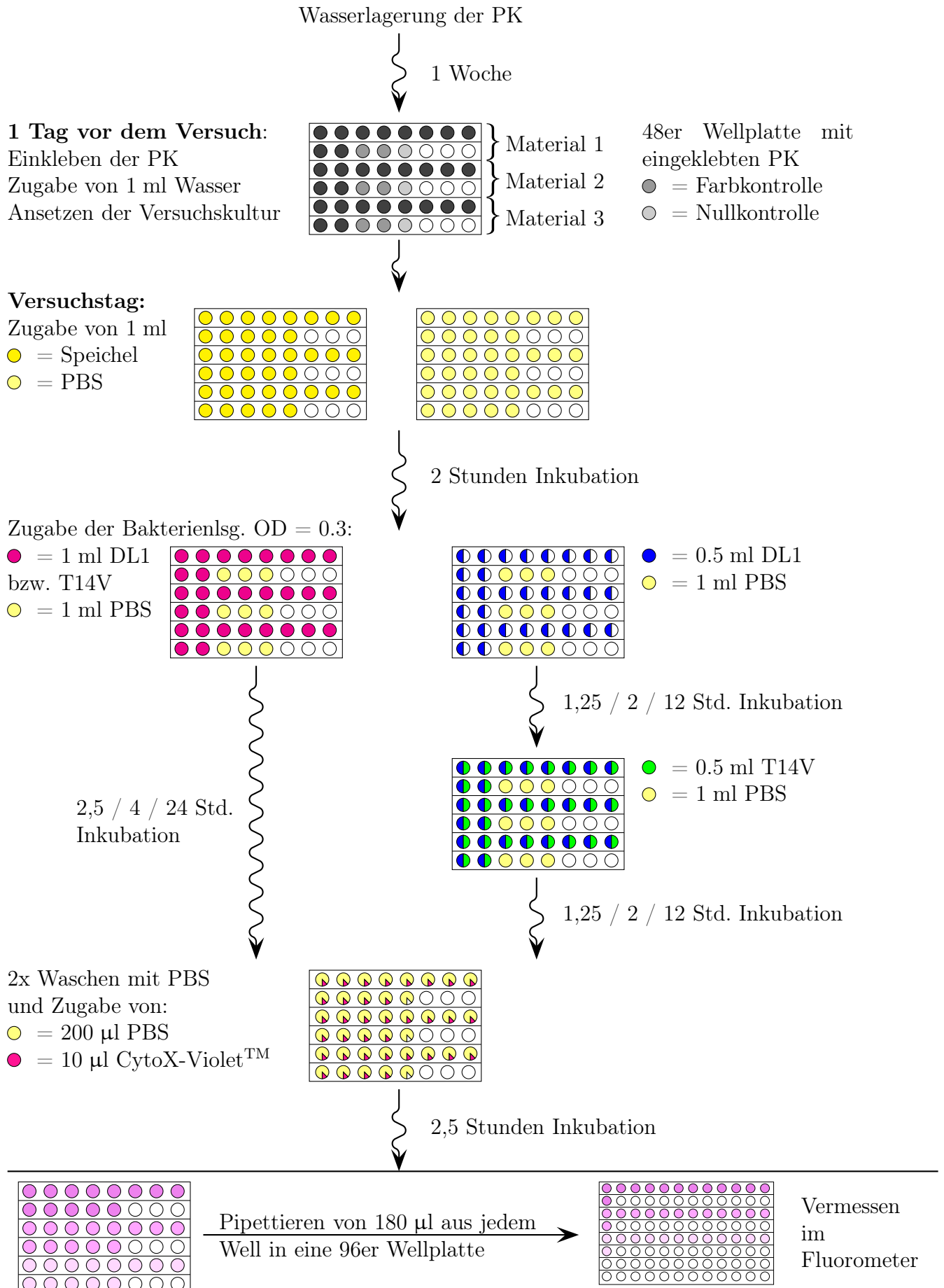


Abbildung 3.6: Versuchsübersicht

### 3.3.4.3 CytoX-Violet™

Bei CytoX-Violet™ handelt es sich um einen seit 2008 auf dem Markt befindlichen Kit, mit dem die Vitalität und Proliferation von Zellen gemessen und die Zytotoxizität von Substanzen getestet werden kann. Dabei kann CytoX-Violet™ sowohl zur Untersuchung von adhärenenten als auch von suspendierten Zellen und Mikroorganismen eingesetzt werden. Zur Messung wird eine spezielle Farbstoff-Komposition verwendet, die in Form einer einzigen Indikatorlösung vorliegt, was laut Hersteller einer einfachen und schnellen Durchführung dienen soll. Durch die Aktivität verschiedener zellulärer Dehydrogenasen kommt es zu einer Fluoreszenz-Veränderung dieser Indikatorlösung, die direkt proportional zur Vitalität bzw. Proliferation der Zellen ist [60]. Der Kit wurde nach persönlicher Kommunikation mit dem Hersteller zur Anwendung bei Streptokokken und Aktinomyzeten freigegeben.

### 3.3.4.4 Biofilmbildung unter dynamischen Bedingungen

Die in Versuchsreihe ③ untersuchten Variablenkombinationen sollten ursprünglich unter dynamischen Bedingungen in einer Fließkammer untersucht werden. Da sich von DL1 keine ausreichend große Menge an Zellen abzentrifugieren ließ, um das erforderliche Volumen der Bakteriensuspension (1125 ml) mit einer optischen Dichte von 0,3 einzustellen, wurden anstelle der dynamischen Inkubationsbedingungen – wie auch schon bei Versuchsreihe ① und ② – semi-statische Versuchsbedingungen angewendet.

Da mit der Einzelkultur von T14V bereits einer der geplanten Fließkammerversuche erfolgreich durchgeführt worden war, bevor ersichtlich wurde, dass sich die Problematik beim Zentrifugieren von DL1 nicht lösen ließ, wird der Aufbau einer Fließkammer trotzdem kurz beschrieben; eine detaillierte Beschreibung des dynamischen Versuchsaufbaus findet sich bei Mühlfriedel [163].

Am Vortag des geplanten Versuchs wurden von jedem der drei Materialien zwölf der wassergelegerten Prüfkörper entnommen und nach ihrer Trocknung mit dem dünnfließenden, additionsvernetzenden Silikon Xantopren (Comfort Medium, Heraeus Kulzer Inc., Armonk, NY, USA) in Träger eingeklebt. Dazu wurden die mit drei runden Aussparungen versehenen Träger auf Glasplatten gelegt, die Prüfkörper mit Hilfe einer Pinzette mit ihrer polierten Fläche zur Glasplatte in die Aussparungen eingelegt und der verbleibende Raum mit Silikon ausgefüllt. Nach dem Aushärten des Materials wurden die Träger samt der eingeklebten Prüfkörper von der Glasplatte gelöst und mit der polierten Seite der Prüfkörper nach oben auf einen Bolzen gelegt, nachdem eventuell vorhandene Silikonüberschüsse auf der Trägerunterseite mit einem Skalpell entfernt worden waren. Die Bolzen wurden mitsamt der Träger in Spritzen (20 ml, BD Discardit™ II, Becton Dickinson, Fraga, E), die als Kammer dienten, eingebracht, wobei der größere der beiden Abstände zwischen Trägerrand und seitlicher Aussparung zur kleinen Öffnung der

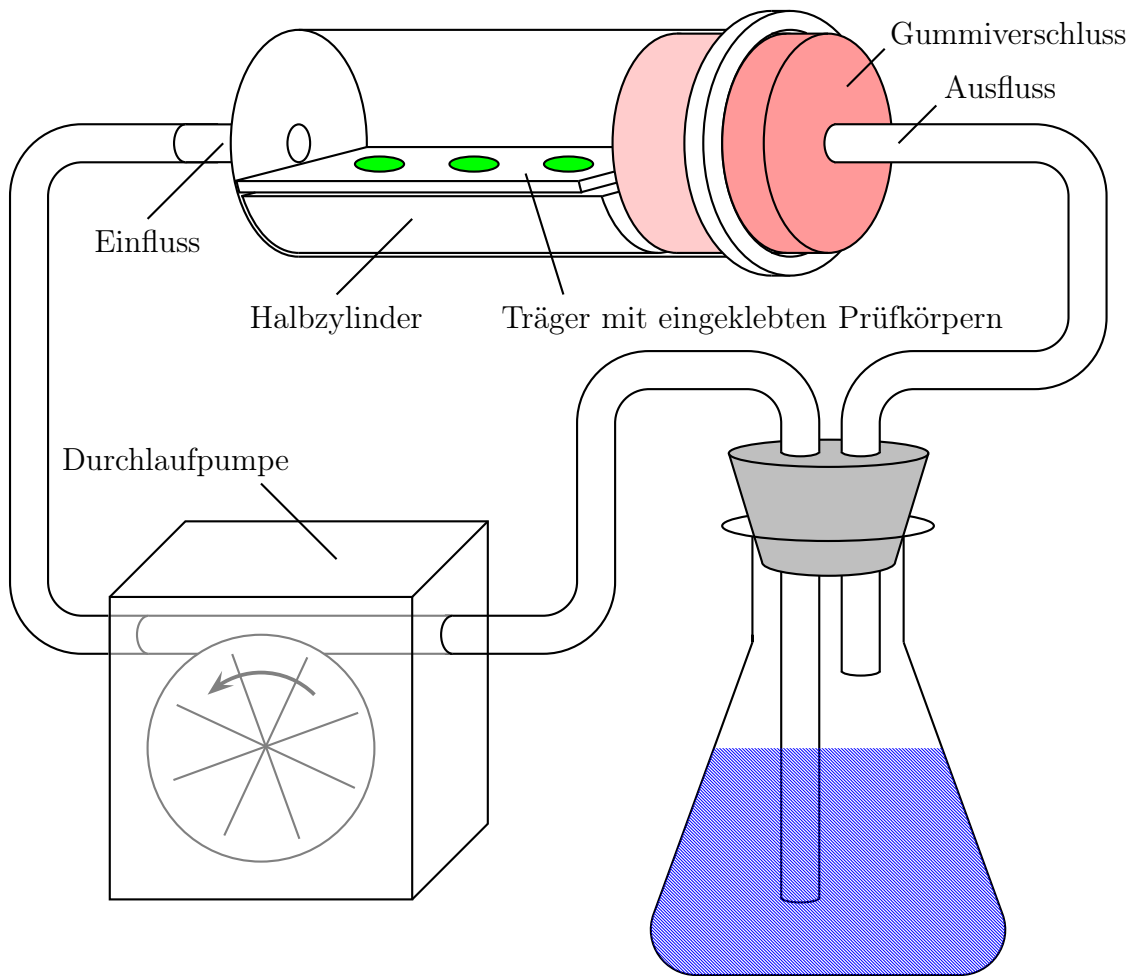


Abbildung 3.7: Fließkammer

Kammer, die später als Einfluss für die Bakterien- und Spüllösungen dienen sollte, ausgerichtet wurde (siehe Abb. 3.7). Anschließend wurde die große Öffnung der Kammer, die den Ausfluss darstellte, mit einem Gummistopfen verschlossen. Ab diesem Zeitpunkt wurde in der Sterilbank gearbeitet. Für jede der zwölf Kammern wurde ein aus mehreren Teilen zusammengesetzter Schlauch in eine Durchlaufpumpe (Ismatec® IPC, Glattbrugg-Zürich, CH) eingespannt und die Kammer an der ersten Kupplung des Schlauchs zwischengeschaltet. Anschließend wurde das luftfrei mit 70%-igem Ethanol befüllte offene Schlauchsystem zehn Minuten lang bei 100% Durchlaufgeschwindigkeit gespült. Nach dem Abpumpen des Ethanols erfolgte ein zweiter offener Durchlauf mit 1,5 Liter sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  bei 100% Durchlaufgeschwindigkeit für zehn Minuten. Das mit  $\text{H}_2\text{O}$  befüllte Schlauchsystem wurde anschließend bis zum nächsten Tag zu einem Kreislauf geschlossen.

Am Versuchstag wurde zunächst das  $\text{H}_2\text{O}$  mit 100% Durchlaufgeschwindigkeit abgepumpt. Danach wurden die Schlauchsysteme der Kammern für Farb- und Nullkontrollen luftfrei mit PBS befüllt und über eine Duranglasflasche mit 375 ml PBS zu einem Kreislauf geschlossen;

die Schlauchsysteme der Prüfkörperkammern wurden luftfrei mit Bakteriensuspension der optischen Dichte von 0,3 befüllt und über eine Duranglasflasche mit 1125 ml dieser Lösung zu einem Kreislauf geschlossen. Der Durchlauf der auf 37 °C temperierten und, um das Verdunsten zu verhindern, abgedeckten Lösungen erfolgte bei einer Geschwindigkeit von 30% für vier Stunden. Nach dieser Zeit wurden die Lösungen abgepumpt, für fünf Minuten bei 30% mit 500 ml PBS gespült und dieses wieder abgepumpt. Aus den anschließend abgekoppelten Kammern wurden die Träger mit den Prüfkörpern vorsichtig entnommen und zum Entfernen von verbliebenen, nicht adhärenen Keimen in PBS getaucht. Die Prüfkörper wurden vorsichtig aus den Trägern entnommen und in 48er Well-Platten (siehe Kap. 3.3.4.2) gelegt. In jedes Well wurden 300 µl PBS und 15 µl CytoX-Violet™ (siehe Kap. 3.3.4.2) pipettiert und die Wells für 2,5 Stunden in lichtdichten, mit feuchten Tüchern ausgelegten Boxen im Schüttelinkubator inkubiert. Nach dieser Zeit wurden – wie in Kapitel 3.3.4.2 beschrieben – aus jedem Well 180 µl entnommen, in eine 96er Well-Platte überführt, diese anschließend in ein automatisiertes Plattenlesegerät (siehe Abb. 3.5) eingelegt und die relative Fluoreszenzintensität (Gain 1500, 1800 und 2000) bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen.

### 3.3.4.5 Rasterelektronenmikroskopie

Mit dem Rasterelektronenmikroskop kann die Oberflächenstruktur massiver Proben mit einem Auflösungsvermögen von nur wenigen Nanometern [189] und einer gegenüber dem Lichtmikroskop 100-fach größeren Schärfentiefe untersucht werden [7]. Da die Vergrößerung in einem sehr großen Bereich (10-fach bis zu 900.000-fach) gewählt werden kann, ist sowohl eine grobe Orientierung auf einer Probe als auch die Analyse feinsten Details möglich [59].

Für die rasterelektronenmikroskopische Analyse wurden unter den zehn Prüfkörpern jedes Szenarios (siehe Tab. 3.1 bis Tab. 3.3) die beiden Prüfkörper mit der jeweils höchsten bzw. niedrigsten relativen Fluoreszenzintensität ausgewählt, da dies auf die höchste bzw. niedrigste Anzahl an adhärenen Bakterien schließen lässt. Die ausgewählten Prüfkörper wurden vorsichtig aus den 48er Well-Platten entnommen, anschließend mit Kohlenstoffklebstoff (Leit-C nach Göcke, Provac GmbH, Oestrich-Winkel, D) auf Probenträgern (Alu-Stubs, Provac GmbH, Oestrich-Winkel, D) fixiert und für eine Woche im Abzug getrocknet. Anschließend wurden die Prüfkörper in einem Sputtergerät (SCD 005 Sputter Coater, BAL-TEC, Walluf, D) bei 30 mA für sechs Minuten durch Aufbringen einer Goldschicht leitfähig gemacht. Die auf diese Weise vorbereiteten Proben wurden im Rasterelektronenmikroskop (Cambridge S240, Cambridge Instruments, Nussloch, D) bei einer Röhrenspannung von 10 kV mit Vergrößerungen zwischen 12,2-fach und 4000-fach untersucht. Dabei wurden die Proben qualitativ-visuell hinsichtlich

der Menge an adhärenen Bakterien beurteilt und repräsentative Ausschnitte bei mindestens 1670-facher Vergrößerung fotodokumentiert.

### 3.3.4.6 Kontaktwinkelmessung und Bestimmung der freien Oberflächenenergie

Die freie Oberflächenenergie ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ ) ist eine physikalische Größe, mit der man die gesamte Energie einer Festkörperoberfläche beschreibt. Sie ist das Äquivalent zur Oberflächenspannung einer Flüssigkeit und kann über Kontaktwinkelmessungen erfasst werden [91]. Der Kontaktwinkel  $\theta$  ist der Winkel zwischen der Flüssigkeitsoberfläche eines auf einem Festkörper liegenden Flüssigkeitstropfens und der Phasengrenze von Flüssigkeit und Festkörper [142] (siehe Abb. 3.8).

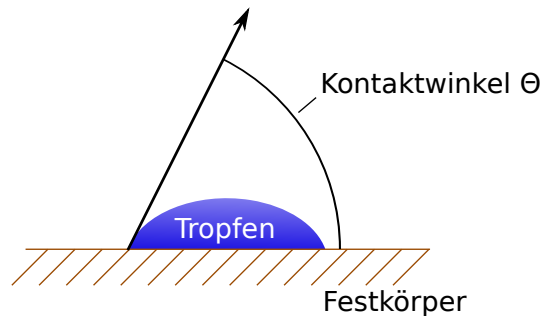


Abbildung 3.8: Kontaktwinkel  $\theta$

Er gibt die Wechselwirkung von Flüssigkeiten mit einer festen Oberfläche wieder, wobei diese von der Polarität, der Hydrophilie und der Benetzbarkeit der beteiligten Komponenten abhängig ist. Wenn es sich bei der Flüssigkeit beispielsweise um Wasser handelt, bedeutet ein großer (über  $90^\circ$ ) Kontaktwinkel, dass eine unpolare, hydrophobe und schlecht benetzbare Oberfläche vorliegt [84, 91, 199]. Für die in der vorliegenden Arbeit angewendete Methode von Owens, Wendt, Rabel und Kaelble zur Bestimmung der freien Oberflächenenergie (siehe unten) wurden für die Kontaktwinkelmessung drei verschiedene Flüssigkeiten mit bekannter Oberflächenspannung benötigt [240].

Zur Anwendung kamen entionisiertes Wasser, Ethylenglykol (Merck, Darmstadt, D) und Methyljodid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), von denen jeweils die Oberflächenspannung sowie die dispersen und polaren Anteile der Oberflächenspannung bekannt waren (siehe Tab. 3.5; Werte nach Ström *et al.* [223]). Mittels eines automatisierten, computergestützten Kontaktwinkelmessgerätes (OCA 15 plus, Data-Physics Instruments GmbH, Filderstadt, D) wurden die Kontaktwinkel der drei Flüssigkeiten nach der Methode des liegenden Tropfens gemessen. Dabei wird an den Dreiphasenpunkt eine Tangente an die Tropfenkontur angelegt und der

Testflüssigkeit	totale Oberflächen- energie OE mJ/m <sup>2</sup>	polare Kompo- nente der OE mJ/m <sup>2</sup>	disperse Kom- ponente der OE mJ/m <sup>2</sup>
Wasser	72,8	51,0	21,8
Ethylenglykol	47,7	16,8	30,9
Methyleniodid	50,8	0,0	50,8

Tabelle 3.5: Oberflächenenergie der für die Kontaktwinkelmessung verwendeten Flüssigkeiten

Winkel zwischen ihr und der Festkörperoberfläche gemessen. Von jedem Material wurden auf vier zufällig ausgewählten Proben jeweils drei Tropfen (0,2 µl) der drei Flüssigkeiten vermes- sen, und jeweils der Durchschnittswert aus linkem und rechtem Kontaktwinkel gebildet. Die Messung erfolgte immer zeitgleich sofort nach dem Auftreffen des Tropfens auf der Oberfläche, um eine Beeinflussung der Messwerte durch die sich verändernde Tropfenkontur zu minimieren. Entsprechend eines Verfahrens von Owens, Wendt, Rabel und Kaelble (OWRK), auf welche die Theorie zurückgeht, dass die freie Oberflächenenergie einer festen Oberfläche zwei Komponen- ten enthält [173], wurden aus den für die drei Flüssigkeiten bestimmten Durchschnittswerten der Kontaktwinkel und den bekannten Oberflächenspannungen die polare (Säure-Base-) und di- sperse (Van-der-Waals-) Komponente sowie die totale freie Oberflächenenergie bestimmt [142].

## 3.4 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

### 3.4.1 SPSS

Zur Dateneingabe, Datentransformation und Datenanalyse wurde die unter dem Namen PASW- Statistics 18 (Predictive Analysis SoftWare) vermarktete Statistiksoftware SPSS (für Windows; Version 18.0.0) der Softwarefirma SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet.

### 3.4.2 Graphische Darstellung

Die Ergebnisdarstellung in Form von Linien- bzw. zweidimensionalen Balkendiagrammen er- folgte mit Hilfe der „open source“-Software gnuplot. gnuplot ist ein Kommandozeilen basiertes- Graphikwerkzeug für Unix, OS/2, MS Windows und andere Betriebssysteme. Abbildung 3.9 zeigt ein Beispieldiagramm:

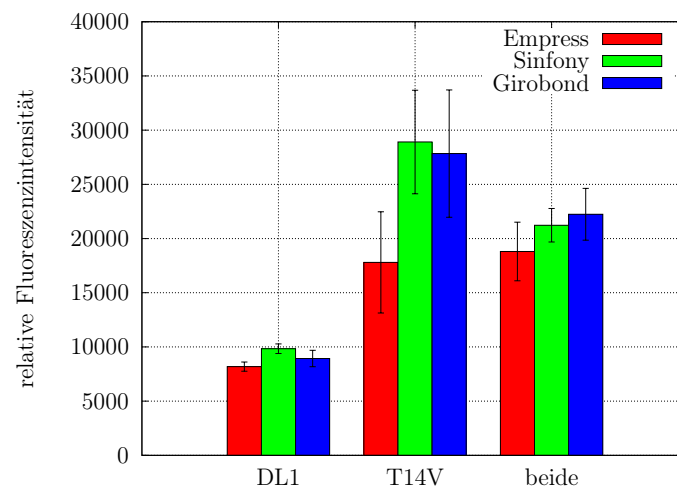


Abbildung 3.9: Beispielgraph

Auf der Ordinatenachse wird die relative Fluoreszenzintensität gruppenweise gegliedert nach Parametern (im Beispiel DL1, T14V, beide) einer Variablen (im Beispiel Keim) aufgetragen. Durch verschiedenfarbige Balken kann die relative Fluoreszenzintensität innerhalb jeder Gruppe hinsichtlich einer weiteren Variable (z.B. Material) verglichen werden (z.B. **rot** = Empress, **grün** = Sinfony, **blau** = Girobond). In jedem Balken ist der positive und der negative Wert der einfachen Standardabweichung eingezeichnet. Dies ermöglicht eine visuelle Abschätzung der Streuung um den Mittelwert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden zudem alle Graphen gleich skaliert.

### 3.4.3 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA = **A**nalysis of **V**ariance) durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein spezielles mathematisch-statistisches Verfahren zur Analyse von quantitativen Messergebnissen, das ursprünglich für biologische Zwecke entwickelt wurde, inzwischen aber in vielen naturwissenschaftlichen, technischen und industriellen Bereichen eingesetzt wird. Mit Hilfe der Varianzanalyse kann man den Einfluss eines qualitativen Merkmals (= Faktor = Einflussvariable = unabhängige Variable, z.B. “Material“) auf ein quantitatives oder meßbares Merkmal (= Zielvariable = abhängige Variable, z.B. “relative Fluoreszenzintensität“) hin untersuchen, indem der Anteil der durch den Faktor hervorgerufenen Treatmentvarianz an der Gesamtvarianz der Versuchsergebnisse ermittelt und mit dem Anteil der durch Zufall verursachten Fehlervarianz verglichen wird [12,62,220]. Wenn zwei Faktoren vorliegen kann nach diesem Prinzip auch die Varianz ihrer Wechselwirkung bestimmt und daraus errechnet werden, ob eine gegenseitige Beeinflussung vorliegt [12,62]. Je nachdem,

ob ein oder mehrere Faktoren vorliegen, unterscheidet man zwischen einfaktorieller (einfacher = oneway) und mehrfaktorieller (multipler) Varianzanalyse [12, 62, 220]. Die Varianzanalyse ermöglicht zudem, den Unterschied mehrerer Stichprobenmittelwerte gleichzeitig auf Signifikanz zu prüfen und stellt somit eine Verallgemeinerung des doppelten T-Tests zum Vergleich von Mittelwerten zweier unabhängiger Stichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten dar [220].

Die mehrfaktorielle ANOVA wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet, um zu untersuchen, ob ein Faktor Einfluss auf das Messergebnis der relativen Fluoreszenzintensität nimmt und ob zwei Faktoren wechselwirken. Mit der einfaktoriellen ANOVA wurde die Nullhypothese  $H_0$ : „Zwischen den Mittelwerten der Gruppen (die den Faktorausprägungen bzw. Faktorstufen (z.B. Girobond, Empress, Sinfony) entsprechen) besteht kein Unterschied.“ geprüft. Die Alternativhypothese besagt dementsprechend, dass zwischen mindestens zwei Mittelwerten ein Unterschied besteht [12, 62].  $H_0$  wurde abgelehnt bzw. die Alternativhypothese bestätigt, wenn das Ergebnis der einfaktoriellen ANOVA den Wert von 0,05, der als Signifikanzniveau  $\alpha$  festgelegt war, unterschritt. Wenn das Ergebnis der einfaktoriellen ANOVA ergab, dass die Nullhypothese  $H_0$  abgelehnt werden muss, es also Unterschiede zwischen mindestens zwei Gruppen gibt, war ein paarweiser Vergleich (Post-Hoc-Test) nötig, um zu klären, zwischen welchen Paaren der Gruppen (z.B. Girobond und Empress; Sinfony und Girobond) ein signifikanter Unterschied bestand [62]. Die Auswahl des Post-Hoc-Tests richtete sich nach dem Ergebnis des Levene-Tests, einem Test auf Homogenität der Varianzen. Homogenitätstest werden durchgeführt, da viele statistische Verfahren voraussetzen, dass die Varianz der Werte der abhängigen Variablen in den Gruppen der unabhängigen Variablen etwa gleich ist. Die Nullhypothese  $H_L$  lautet hier: „Alle Gruppenvarianzen sind gleich“. Die Alternativhypothese besagt demnach, dass mindestens ein Gruppenpaar ungleiche Varianzen besitzt [117]. Auch hier war das Signifikanzniveau  $\alpha$  auf einen Wert von 0,05 festgelegt. Wenn die Nullhypothese  $H_L$  bestätigt wurde ( $\alpha = 0,05$  überschritten), wurde als Post-Hoc-Test der Tukey-Test und im entgegengesetzten Fall ( $\alpha = 0,05$  unterschritten) der Games-Howell-Test verwendet [217].



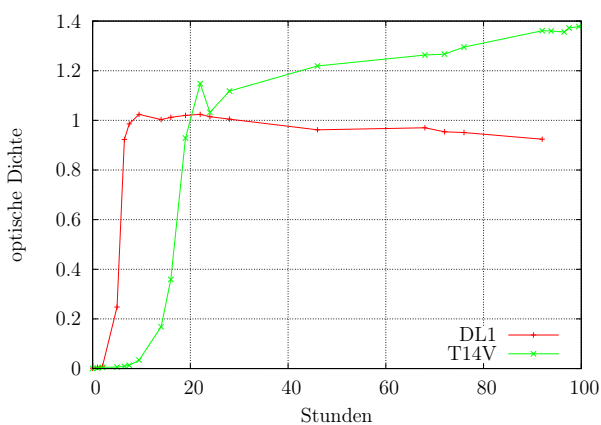
# Kapitel 4

## Ergebnisse

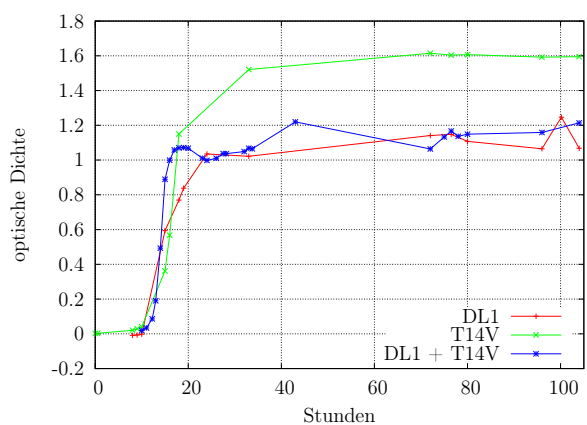
### 4.1 Vorversuche

#### 4.1.1 Wachstumskurven

Einzel- und Kokulturen von DL1 und T14V wurden wie in Kapitel 3.3.2.2 beschrieben gezüchtet und zu diversen Zeitpunkten photometrisch vermessen (siehe Kap. 3.3.3.1). Die Abbildungen 4.1(a) und 4.1(b) zeigen die aus den Messwerten ermittelten Wachstumskurven:



(a) Wachstumskurven der Einzelkulturen



(b) Wachstumskurven von Einzelkulturen und der aus ihnen gebildeten Kokultur

Abbildung 4.1: Wachstumskurven

#### Wachstumsverhalten der Einzelkulturen:

Man erkennt, dass sich DL1 und T14V deutlich in ihren Wachstumskurven unterscheiden. Während DL1 eine kurze lag-Phase von circa zwei Stunden aufweist, dauert diese bei T14V deutlich länger an, so dass die Aktinomyzeten erst neun bis zehn Stunden nach dem Überimpfen in die

exponentielle Phase eintreten. Diese Phase dauert bei DL1 circa acht Stunden an, d.h. die Bakterien gehen etwa zehn Stunden nach dem Anzüchten in die stationäre Phase über; am leichten Abfallen der Kurve erkennt man, dass DL1 schließlich in die Absterbephase übergeht. Bei T14V ist die exponentielle Phase nicht so deutlich abgegrenzt; der Übergang in die stationäre Phase erfolgt weniger abrupt etwa 20 Stunden nach dem Überimpfen. Auch nach mehr als vier Tagen kann man ein Eintreten der Absterbephase nicht erkennen. Infolge dieser Feststellungen wurden Versuchskulturen von T14V in den folgenden Versuchen zehn Stunden früher angesetzt als diejenigen von DL1, wenn sich die Zellen beider Keime zum Zeitpunkt der Herstellung der normierten Lösungen am Beginn der stationären Phase befinden sollten.

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Kulturen zeigte vitale Zellen, deren Zahl mit den Ergebnissen der OD-Messung korrelierte, d.h. anfangs war eine geringe, mit Beginn der exponentiellen Phase eine steigende Zahl an Zellen zu erkennen.

#### **Wachstumsverhalten der Kokultur:**

Um Aussagen über die Beeinflussung des Wachstums bei Ko-Inkubation der beiden Keime zu erhalten, wurden zwei Stunden nach dem Animpfen von DL1 und zehn Stunden nach dem Animpfen von T14V (was acht Stunden früher erfolgt war als für DL1) aus beiden Kulturen gleiche Volumina zusammengeführt und inkubiert. Diese Zeiten wurden gewählt, damit die Zellen beider Keime zu Beginn ihrer exponentiellen Wachstumsphase zusammentrafen.

Abbildung 4.1(b) lässt erkennen, dass nach dem Zusammenführen der beiden Keime die exponentielle Phase ähnlich schleichend beginnt wie bei einer Einzelkultur von T14V. Sie dauert etwa fünf Stunden an. Der weitere Kurvenverlauf und die Höhe der erreichten OD-Werte gleichen einer DL1-Einzelkultur.

Die lichtmikroskopische Beurteilung zeigte in der stationären Phase wenig einzelne Stäbchen, mehr einzelne Kokken und kleine Koaggregate aus beiden Arten von Zellen.

#### **Fazit:**

- Die Wachstumskurven beider Keime unterscheiden sich deutlich sowohl voneinander als auch von der Wachstumskurve einer Kokultur.
- Die beiden Keime beeinflussen sich in ihrem Wachstum: Zunächst bremst T14V das Wachstum von DL1, in der stationären Phase dreht sich dieses Verhältnis um.
- Als geeignete Inkubationszeit zeigten sich 10 Stunden für DL1 und 20 Stunden für T14V, da nach diesen Zeiträumen jeweils die stationäre Wachstumsphase erreicht war.
- T14V muss aufgrund seines verzögerten Anwachsens etwa acht Stunden früher angesetzt werden als DL1, wenn sich beide Keime gleichzeitig am Beginn ihrer exponentiellen Wachstumsphase befinden sollen.

### 4.1.2 Zellzahlbestimmung

Einzel- und Kokulturen von DL1 und T14V wurden wie in Kapitel 3.3.2.2 beschrieben gezüchtet und nach Ablauf der Inkubationszeit mit PBS auf eine optische Dichte von 0,3 eingestellt. Je ein Milliliter dieser Bakteriensuspensionen wurde mit PBS auf 1:10 bis 1:1.000.000 verdünnt und je 50 µl der verdünnten Lösungen ausplattiert. Das Auszählen der Agarplatten ergab für die einzelnen Verdünnungen die in Tabelle 4.1(a) und Tabelle 4.1(b) aufgeführten Koloniezahlen.

(a)			(b)		
Verdünnung	DL1	T14V	Verdünnung	Variante 1 Kolonien insg./ T14V-Kolonien	Variante 2 Kolonien insg./ T14V-Kolonien
1:10	Rasen	Rasen	1:10	Rasen	Rasen
1:100	Rasen	Rasen	1:100	Rasen	Rasen
1:1.000	928	724	1:1.000	Rasen/50	Rasen/220
1:10.000	293	247	1:10.000	395/28	265/93
1:100.000	25	46	1:100.000	35/-	21/10
1:1.000.000	1	1	1:1.000.000	1/-	-

Tabelle 4.1: Koloniezahlen nach Ausplattieren der Einzelkulturen (a) bzw. Kokulturen (b)

#### Einzelkulturen:

Die Koloniezahlermittlung wurde genutzt, um die Zellzahl zu bestimmen, die in einem Milliliter der auf die optische Dichte von 0,3 eingestellten Bakteriensuspension enthalten war. Da im Rahmen der Hauptversuche untersucht werden sollte, inwieweit sich die Adhäsion der verschiedenen Keime unterscheidet, wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit überprüft, ob in gleichen Volumina einer auf OD = 0,3 eingestellten DL1-Suspension und einer auf OD = 0,3 eingestellten T14V-Suspension etwa gleich viele Zellen enthalten sind. Bei beiden Keimen waren es der Auszählung zufolge etwa  $2 \times 10^7$  Zellen je Milliliter Bakteriensuspension.

#### Kokultur:

Im Gegensatz zur Wachstumskurve der ko-inkubierten Keime, bei der nicht davon ausgegangen werden konnte, dass circa gleich viele Zellen der beiden Keime für die Kokultur vermischt worden waren, wurden bei Variante 1 gleiche Volumina der auf OD = 0,3 normierten Suspensionen von DL1 und T14V zusammengegeben und für 20 Stunden inkubiert und somit das gemeinsame Wachstum ausgehend von etwa gleichen Zellzahlen beider Keime begonnen. Allerdings hatte T14V so nicht den sonst berücksichtigten „Vorsprung“. Bei Variante 2 wurde die normierte T14V-Suspension zehn Stunden lang, die normierte DL1-Suspension zwei Stunden lang jeweils einzeln inkubiert. Als anschließend aus jeder Kultur das gleiche Volumen zusammengegeben

wurde, um für weitere zehn Stunden gemeinsam inkubiert zu werden, waren also wieder etwa gleiche Zellzahlen in jedem Volumen enthalten, zusätzlich befanden sich diese Zellen am Beginn der exponentiellen Phase, also auch im gleichen Stadium ihres Wachstums.

Nachdem die Inkubation beendet war, wurden die gewachsenen Kokulturen vor dem Ausplattieren lichtmikroskopisch untersucht. Bei Variante 1 waren dabei fast ausschließlich Kokken zu erkennen, was dafür spricht, dass DL1 durch das frühere Erreichen der Wachstumsphase das Wachstum von T14V unterdrückt hatte. Bei Variante 2, bei der T14V in seiner langen lag-Phase ungestört war, wurden zwar auch überwiegend Kokken vorgefunden, jedoch auch einzelne Stäbchen. Koaggregate konnten nicht festgestellt werden. Auch die Ergebnisse der Koloniezahlbestimmung zeigen, dass bei Variante 2 deutlich mehr Aktinomyzeten gewachsen waren als bei Variante 1.

Aus dem Vergleich der Ergebnisse der Koloniezahlbestimmung der entsprechend Variante 2 gewachsenen Kokultur und den Ergebnissen der Koloniezahlbestimmung der Einzelkulturen kann in Ergänzung zur gemeinsamen Wachstumskurve zudem vermutet werden, dass DL1 und T14V durch die gegenseitige Beeinflussung im Wachstum gebremst werden.

#### **Fazit:**

- In gleichen Volumina normierter Lösungen sind bei DL1 und T14V in etwa gleich viele Zellen vorhanden.
- Der Einwand, das Ergebnis der gemeinsamen Wachstumskurve könnte auf einer ungleichen Anzahl an inokulierten Zellen beider Keime beruhen, wird nicht bestätigt, da auch das Wachstum einer Kokultur aus näherungsweise gleichen Zellzahlen im Vergleich zum Wachstum der Einzelkulturen reduziert ist.
- Beim Ansetzen einer Kokultur spielt es eine Rolle, zu welchem Zeitpunkt ihres Wachstums die beiden Keime gemischt werden – wenn sich nicht beide Keime am Beginn ihrer exponentiellen Phase befinden, wird das Wachstum von T14V durch DL1 unterdrückt.

## **4.2 Kontaktwinkelmessung**

Zur Charakterisierung der Oberflächeneigenschaften von Empress, Sinfony und Girobond wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt und daraus der polare und disperse Anteil der freien Oberflächenenergie sowie die gesamte freie Oberflächenenergie nach dem Verfahren von Owens *et al.* [173] berechnet. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in Tabelle 4.2 aufgeführt:

	Empress	Sinfony	Girobond
polar	$3,35 \pm 1,16$	$2,53 \pm 0,74$	$3,18 \pm 1,19$
dispers	$39,74 \pm 1,47$	$37,82 \pm 1,45$	$32,66 \pm 1,12$
total	$43,09 \pm 1,87$	$40,35 \pm 1,63$	$35,84 \pm 1,64$

Tabelle 4.2: Oberflächenenergien mit Standardabweichungen (Angaben in  $\text{mJ/m}^2$ )

Abbildung 4.2(a) zeigt für jedes der drei Materialien, wie sich die polare und disperse Komponente der freien Oberflächenenergie zueinander und zur gesamten freien Oberflächenenergie verhalten. Abbildung 4.2(b) zeigt einen Vergleich der Materialien hinsichtlich ihrer polaren und dispersen Komponente der freien Oberflächenenergie und ihrer gesamten freien Oberflächenenergie.

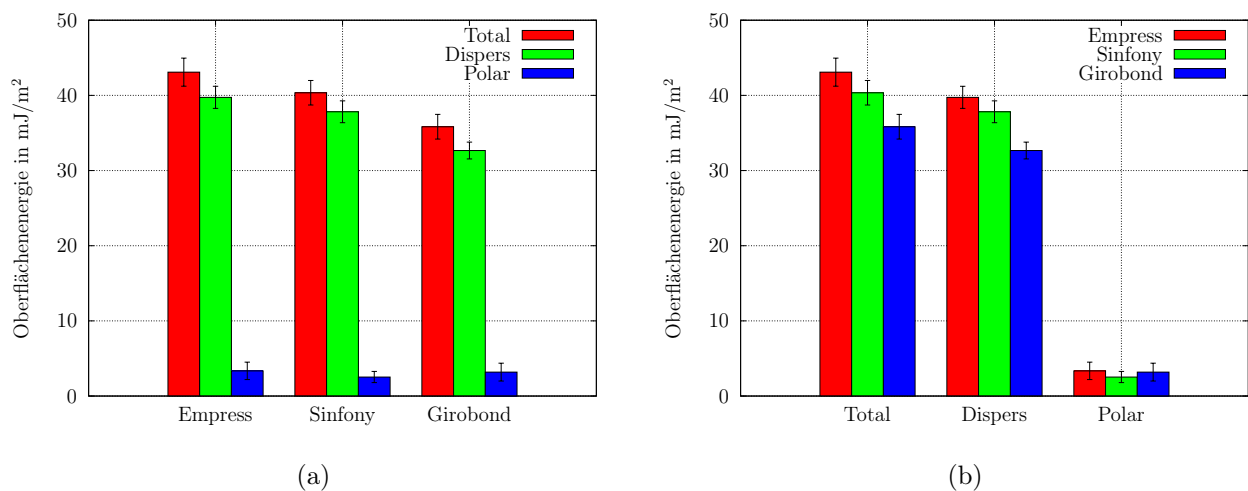


Abbildung 4.2: Vergleich der totalen freien Oberflächenenergien und ihrer Komponenten

Es wurde statistisch untersucht, ob sich die polaren bzw. dispersen Komponenten der freien Oberflächenenergie bzw. die gesamten freien Oberflächenenergien der Materialien Empress, Sinfony und Girobond signifikant voneinander unterscheiden ( $E \leftrightarrow S$ ,  $E \leftrightarrow G$ ,  $S \leftrightarrow G$ ).

Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) und der Post-Hoc-Tests (Tukey,  $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der Signifikanztests sind rot markiert (ANOVA) bzw. farbig hinterlegt (Post-Hoc), wenn überzufällige Unterschiede vorliegen (vgl. Abb. 4.2(b)).

	polar	dispers	total
ANOVA	0,625	0,002	0,006
E ↔ S	0,628	0,269	0,204
E ↔ G	0,979	0,002	0,005
S ↔ G	0,740	0,008	0,041

$$\boxed{\phantom{0}} = G < E/S$$

Tabelle 4.3: Statistische Auswertung zum Vergleich der polaren bzw. dispersen Komponenten der Oberflächenenergie bzw. der gesamten Oberflächenenergien der verschiedenen Materialien; Probenanzahl  $n = 12$

Sowohl der disperse Anteil der freien Oberflächenenergie als auch die totale freie Oberflächenenergie waren bei Empress und bei Sinfony signifikant höher als bei Girobond. Zwischen Empress und Sinfony ließen sich weder hinsichtlich der totalen freien Oberflächenenergie noch hinsichtlich ihrer Komponenten signifikante Unterschiede feststellen.

#### Zusammenfassung:

Während sich Empress und Sinfony weder in ihrer freien Oberflächenenergie noch in ihren dispersen und polaren Komponenten signifikant unterscheiden, besitzt Girobond eine geringere freie Oberflächenenergie und disperse Komponente als Empress und Sinfony.

Auf die Bedeutung dieser Ergebnisse wird in Kapitel 5.2.4 im Rahmen der Diskussion eingegangen.

## 4.3 Hauptversuche

Die statistische Auswertung der in Versuchsreihe ① bis ③ erfassten Daten lässt Aussagen darüber zu, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörpern, die

- aus verschiedenen Materialien gefertigt waren,  
→ ①, ② (Palapress ↔ Glas), ③ (Empress ↔ Girobond ↔ Sinfony ↔ Empress),
- unterschiedliche Oberflächenrauigkeiten aufwiesen,  
→ ② (glattes Palapress ↔ raues Palapress),
- mit verschiedenen Keimen inkubiert waren,  
→ ①, ②, ③ (DL1 ↔ T14V ↔ beide ↔ DL1)
- unterschiedlich lang mit einem Keim inkubiert waren,  
→ ① (2,5 ↔ 4 ↔ 24 ↔ 4),

- vor der Inkubation mit Bakterien zur Bildung einer Pellikel mit Speichel inkubiert worden waren und solchen, die nicht mit Speichel inkubiert worden waren  
 $\rightarrow$  ①, ②, ③ (+  $\leftrightarrow$  -)

signifikant voneinander unterschieden; daraus können Rückschlüsse auf die Bedeutung der Faktoren **Material**, **Rauigkeit**, **Keim**, **Inkubationszeit** und **Pellikel** für die bakterielle Adhäsion bzw. Biofilmbildung gezogen werden.

Die Bedeutung dieser Faktoren lässt sich durch die graphische Darstellung der relativen Fluoreszenzintensitäten veranschaulichen. Unter der Vielzahl an möglichen Darstellungsvarianten wurden die Varianten gewählt, bei denen die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten sortiert nach Material und gruppenweise gegliedert nach Keim (in Versuchsreihe ①, ②, ③) bzw. Inkubationszeit (in Versuchsreihe ①) bzw. erfolgter oder nicht erfolgter Pellikelbildung (in Versuchsreihe ①, ②, ③) aufgetragen sind (siehe Kap. 3.4.2). Damit ist sowohl ein schneller Vergleich der Materialien als auch eine Beurteilung des Einflusses des Keims, der Inkubationszeiten und der gebildeten Pellikel auf die Kolonisierung der Prüfkörper möglich.

#### 4.3.1 Versuchsreihe ①

In Versuchsreihe ① wurde untersucht, wie sich verschiedene Inkubationszeiten, die Inkubation mit verschiedenen Keimen, die Anwesenheit einer Pellikelschicht und das Material, aus dem die Prüfkörper gefertigt waren, auf die Kolonisierung der Prüfkörper auswirken.

Dazu wurden Prüfkörper aus Palapress (mittlere Rauigkeit: 0,07  $\mu\text{m}$ ) und aus einem Referenzmaterial (Glas) nach Inkubation mit Speichel bzw. PBS für 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, 4 oder 24 Stunden mit DL1 bzw. T14V bzw. beiden Keimen inkubiert (siehe Tab. 3.1).

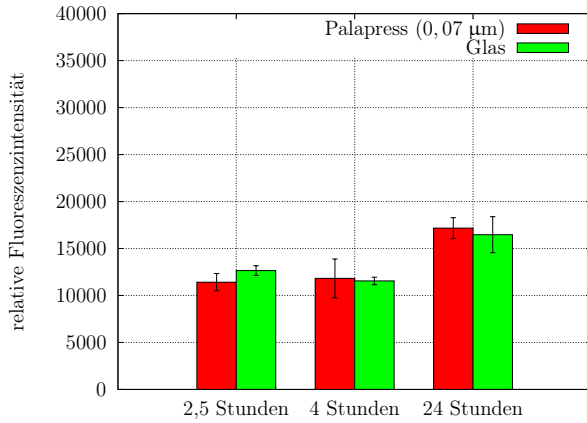
Tabelle 4.4 gibt die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten wieder (gerundete Mittelwerte; Messung bei Gain 2000):

	DL1		T14V		beide		
2,5	11415	12654	21911	17995	13763	12598	+
4	11820	11548	18348	14514	15780	14542	
24	17196	16472	10803	11203	20846	18096	
2,5	12761	12330	27471	26156	17369	16832	-
4	12173	11542	23296	22136	17797	19076	
24	19804	18709	15872	12939	22221	20282	
	P	G	P	G	P	G	

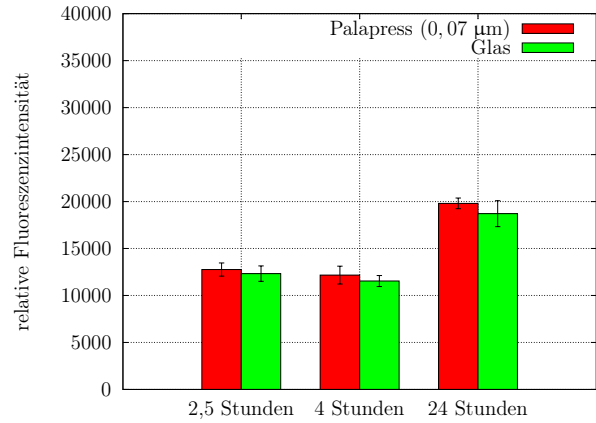
P = Palapress  
 G = Glas  
 + = mit Pellikel  
 - = ohne Pellikel

Tabelle 4.4: Relative Fluoreszenzintensitäten

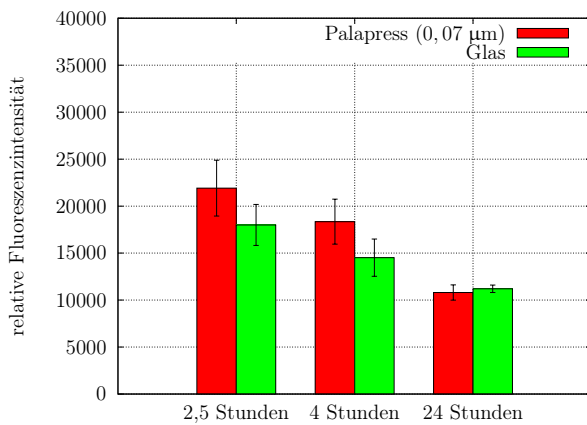
#### 4.3.1.1 Vergleich der bakteriellen Adhäsion/Biofilmbildung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten



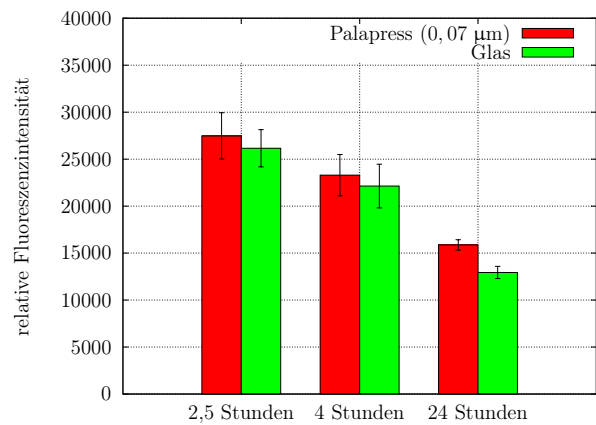
(a) Keim: DL1; mit Pellikel



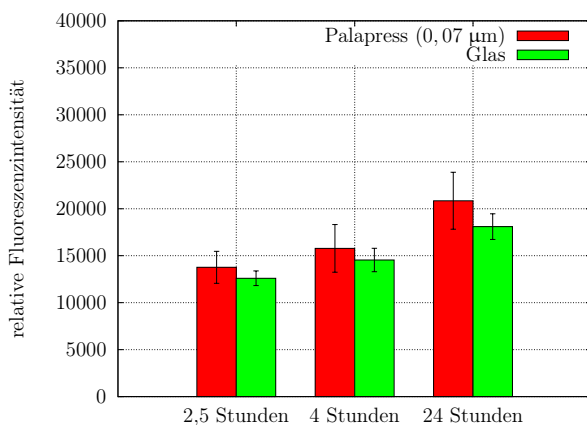
(b) Keim: DL1; ohne Pellikel



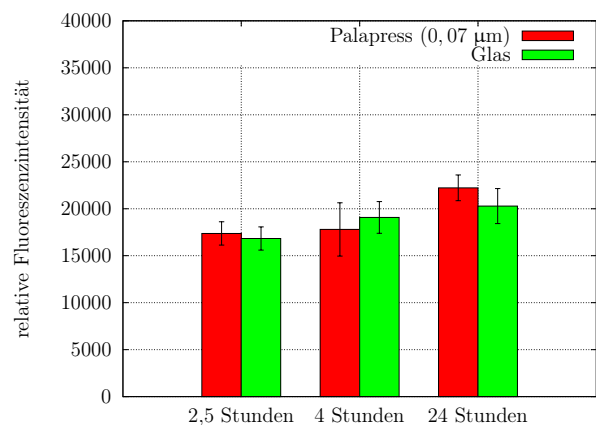
(c) Keim: T14V; mit Pellikel



(d) Keim: T14V; ohne Pellikel



(e) Keim: beide; mit Pellikel



(f) Keim: beide; ohne Pellikel

Abbildung 4.3: Einfluss des Materials und der Inkubationszeit auf die relative Fluoreszenzintensität unter verschiedenen Inkubationsbedingungen



Es wurde statistisch untersucht, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper für 2,5 Stunden signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper für 4 bzw. 24 Stunden unterschieden und ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper für 4 Stunden signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper für 24 Stunden unterschieden ( $2,5 \leftrightarrow 4$ ,  $2,5 \leftrightarrow 24$ ,  $4 \leftrightarrow 24$ ).

Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) und der Post-Hoc-Tests (Games-Howell,  $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der Signifikanztests sind rot markiert (ANOVA) bzw. farbig hinterlegt (Post-Hoc), wenn überzufällige Unterschiede vorliegen. Die verschiedenen Farben zeigen an, nach welcher Inkubationszeit im Einzelfall eine höhere relative Fluoreszenzintensität festgestellt wurde (vgl. Abb. 4.3).

	DL1		T14V		beide		
ANOVA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	+
2,5 $\leftrightarrow$ 4	0,840	0,000	0,023	0,004	0,124	0,002	
2,5 $\leftrightarrow$ 24	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
4 $\leftrightarrow$ 24	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002	0,000	
ANOVA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-
2,5 $\leftrightarrow$ 4	0,286	0,061	0,002	0,002	0,901	0,010	
2,5 $\leftrightarrow$ 24	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
4 $\leftrightarrow$ 24	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,307	
	P	G	P	G	P	G	

= 4 < 2,5 < 24

= 24 < 4 < 2,5

= 2,5 = 4 < 24

= 2,5 < 4 < 24

Tabelle 4.5: Statistische Auswertung zum Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten nach verschiedenen Inkubationszeiten; Probenanzahl  $n = 30$

Bei Prüfkörpern aus Palapress und dem Referenzmaterial (Glas) zeigten sich in fast allen Fällen für eine Inkubationszeit von 24 Stunden sowohl bei Inkubation mit DL1 als auch bei Ko-Inkubation mit beiden Keimen signifikant höhere relative Fluoreszenzintensitäten als für Inkubationszeiten von 2,5 und 4 Stunden. Zwischen 2,5 und 4 Stunden konnten hingegen nur bei Glas nicht aber bei Palapress signifikante Unterschiede festgestellt werden (Ausnahme: Inkubation von Glas mit DL1 ohne Speichelinkubation). Bei Inkubation der Prüfkörper aus Palapress und Glas mit T14V zeigten sich nach 24-stündiger Inkubation signifikant niedrigere relative Fluoreszenzintensitäten als nach 4 Stunden; nach 4-stündiger Inkubation mit T14V waren die relativen Fluoreszenzintensitäten wiederum signifikant niedriger als nach 2,5 Stunden.

**Schlussfolgerung:**

Da eine hohe relative Fluoreszenzintensität mit einer hohen Anzahl an vitalen, adhärenen Zellen korreliert, deuten die Ergebnisse der statistischen Auswertung darauf hin, dass sich die Inkubationszeit auf die Adhäsion der untersuchten Keime unterschiedlich auswirkte: während DL1 mit zunehmender Inkubationszeit vermehrt adhärierte, nahm die Anzahl an vitalen, adhärenen Aktinomyzeten ab.

Diese Schlussfolgerung wird auch durch die rasterelektronenmikroskopische Analyse unterstützt. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 4.4 die Oberflächen von Prüfkörpern aus Palapress gezeigt, welche nach Inkubation mit Speichel für 2,5 Stunden (a) bzw. 4 Stunden (b) bzw. 24 Stunden (c) mit DL1 inkubiert worden waren: während bei (c) dicht zusammenliegende Kokken zu erkennen sind, zeigen (a) und (b) nur wenige Zellen.

In Kapitel 5.2.1 wird der Zusammenhang zwischen Inkubationszeit/Keim und Biofilmbildung detailliert diskutiert.

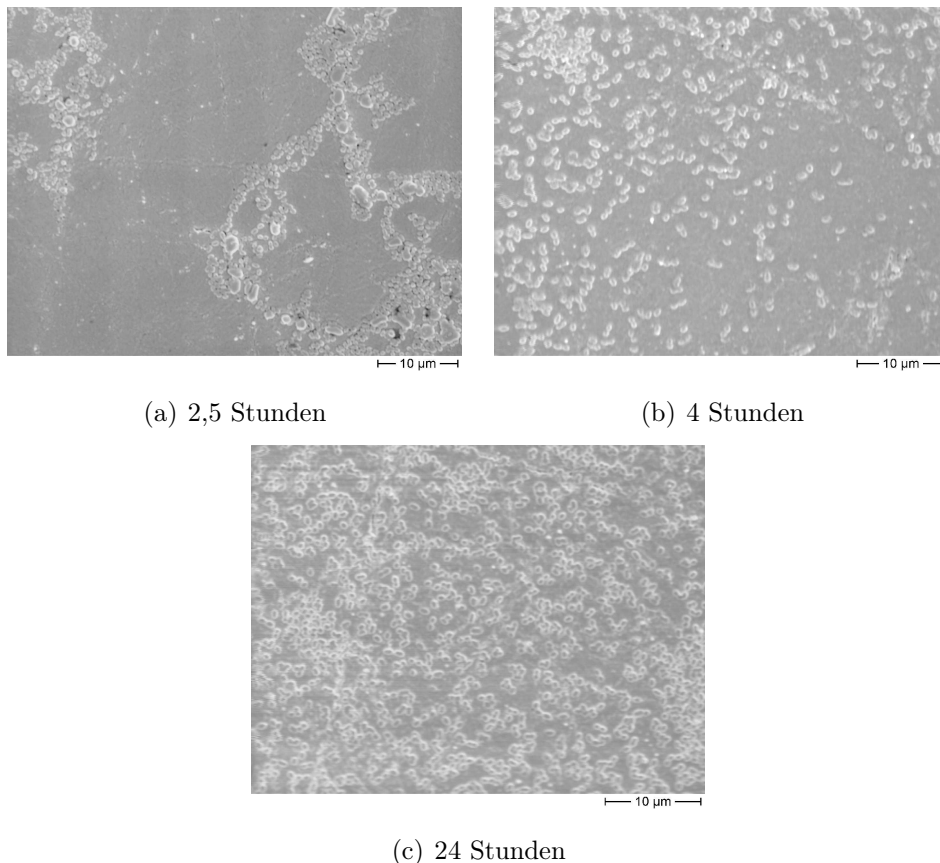
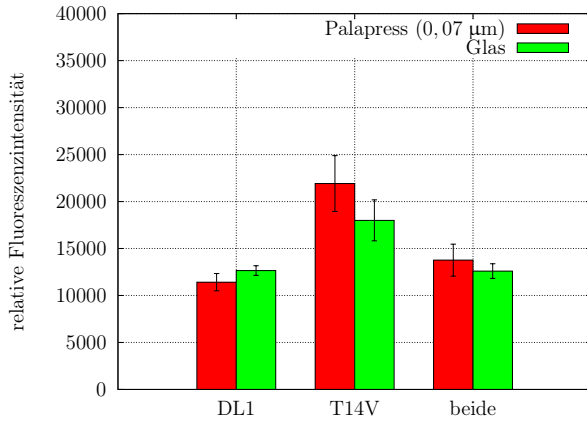
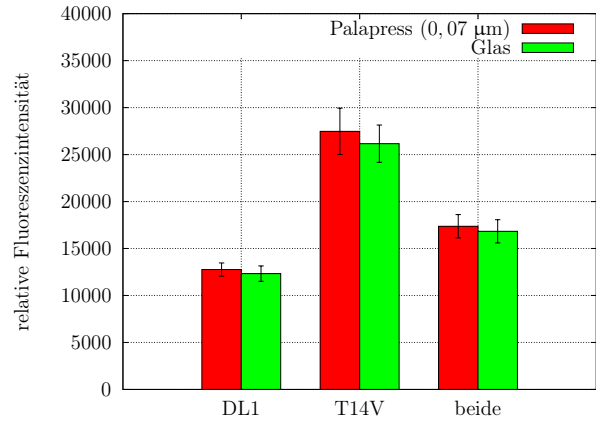


Abbildung 4.4: Adhäsion und Biofilmbildung von DL1 an Palapress nach verschiedenen Inkubationszeiten; Vergrößerung: 1670-fach (a), 1830-fach (b), 2000-fach (c)

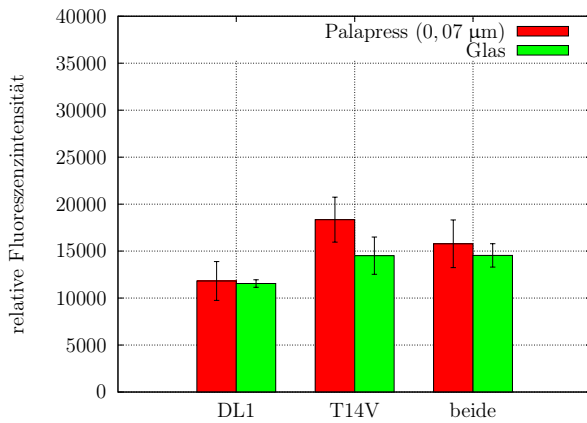
#### 4.3.1.2 Adhäsion/Biofilmbildung der verschiedenen Keime im Vergleich



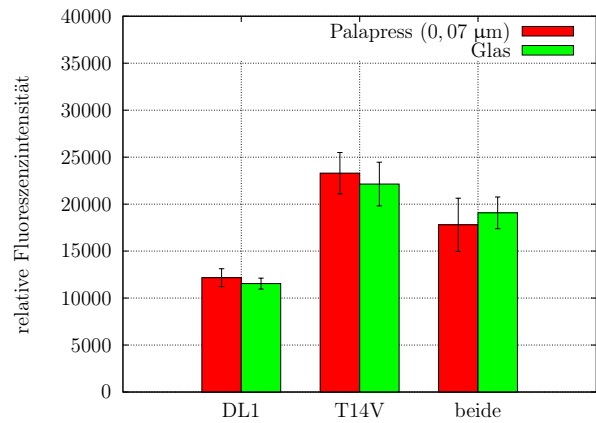
(a) mit Pellikel; Inkubationszeit: 2,5 Stunden



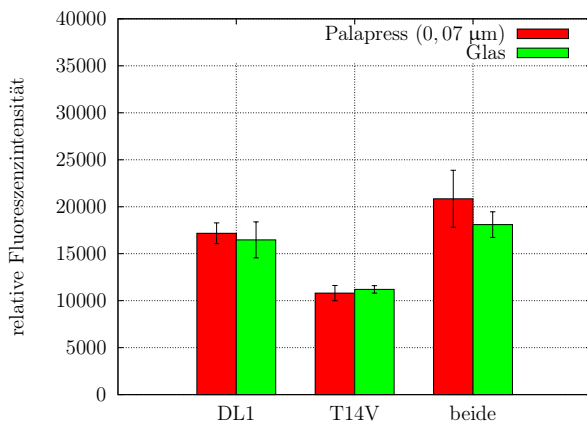
(b) ohne Pellikel; Inkubationszeit: 2,5 Stunden



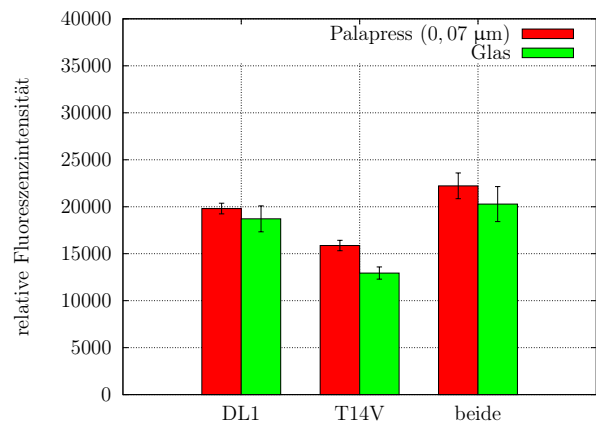
(c) mit Pellikel; Inkubationszeit: 4 Stunden



(d) ohne Pellikel; Inkubationszeit: 4 Stunden



(e) mit Pellikel; Inkubationszeit: 24 Stunden



(f) ohne Pellikel; Inkubationszeit: 24 Stunden

Abbildung 4.5: Einfluss des Materials und des Keims auf die relative Fluoreszenzintensität unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Es wurde statistisch untersucht, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper mit DL1 signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper mit T14V bzw. beiden Keimen unterschieden und ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper mit T14V signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper mit beiden Keimen unterschieden (DL1  $\leftrightarrow$  T14V, DL1  $\leftrightarrow$  beide, T14V  $\leftrightarrow$  beide).

Tabelle 4.6 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) und der Post-Hoc-Tests (Games-Howell,  $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der Signifikanztests sind rot markiert (ANOVA) bzw. farbig hinterlegt (Post-Hoc), wenn überzufällige Unterschiede vorliegen. Die verschiedenen Farben zeigen an, bei welchem Keim im Einzelfall eine höhere relative Fluoreszenzintensität festgestellt wurde (vgl. Abb. 4.5).

	2,5		4		24		
ANOVA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	+
DL1 $\leftrightarrow$ T14V	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	
DL1 $\leftrightarrow$ beide	0,005	0,980	0,004	0,000	0,010	0,105	
T14V $\leftrightarrow$ beide	0,000	0,000	0,078	0,999	0,000	0,000	
ANOVA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-
DL1 $\leftrightarrow$ T14V	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
DL1 $\leftrightarrow$ beide	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,111	
T14V $\leftrightarrow$ beide	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	
	P	G	P	G	P	G	

	= DL1 < beide < T14V
	= T14V < DL1 < beide

Tabelle 4.6: Statistische Auswertung zum Vergleich der Adhäsion/Biofilmbildung der verschiedenen Keime; Probenanzahl  $n = 30$

Abgesehen von fünf Fällen, in denen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten (siehe Tab. 4.6), zeigten sich nach Inkubationszeiten von 2,5 und 4 Stunden bei Inkubation von Prüfkörpern aus Palapress und Glas mit T14V signifikant höhere relative Fluoreszenzintensitäten als bei Ko-Inkubation mit beiden Keimen; bei Ko-Inkubation mit beiden Keimen zeigten sich signifikant höhere relative Fluoreszenzintensitäten als bei Inkubation mit DL1. Letzteres kann auch nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden festgestellt werden; bei Inkubation mit T14V zeigten sich nach dieser Inkubationszeit die niedrigsten relativen Fluoreszenzintensitäten.

### Schlussfolgerung:

Da eine hohe relative Fluoreszenzintensität mit einer hohen Anzahl an vitalen, adhärenen Zellen korreliert, lassen die Ergebnisse der statistischen Auswertung darauf schließen, dass die untersuchten Keime in unterschiedlichem Ausmaß adhärten, wobei dieses von der Inkubationszeit abhängig war: während T14V nach kurzen Inkubationszeiten häufiger adhärte als DL1 bzw. DL1 und T14V, adhärten die Aktinomyzeten nach 24 Stunden in geringerer Anzahl als DL1 bzw. DL1 und T14V (siehe dazu auch Kap. 4.3.1.1).

Auch die rasterelektronenmikroskopische Analyse unterstützt diese Schlussfolgerung. Stellvertretend sind in Abbildung 4.6 die Oberflächen von Prüfkörpern aus Glas gezeigt, die ohne vorhergehende Pellikelbildung 2,5 Stunden lang mit DL1 (a) bzw. T14V (c) bzw. beiden Keimen (b) inkubiert worden waren; die Aufnahmen lassen locker angeordnete Kokken (a) sowie dicht zusammenliegende Stäbchen (c) erkennen.

In Kapitel 5.2.1 wird der Zusammenhang zwischen Inkubationszeit/Keim und Biofilmbildung detailliert diskutiert.

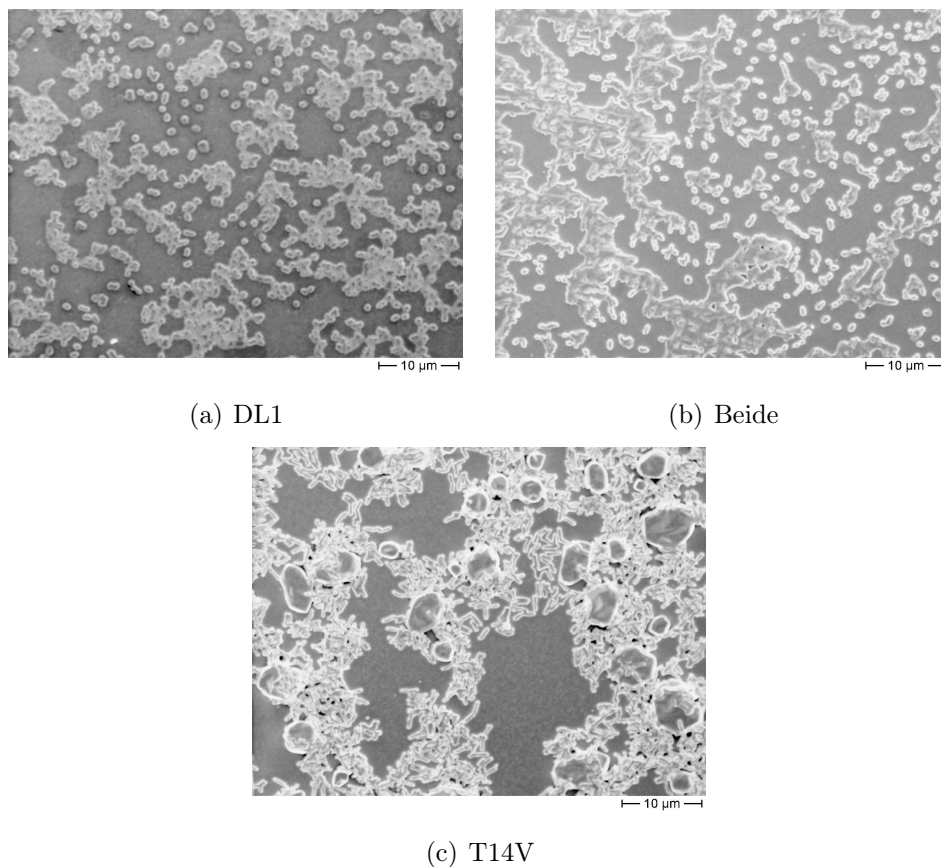
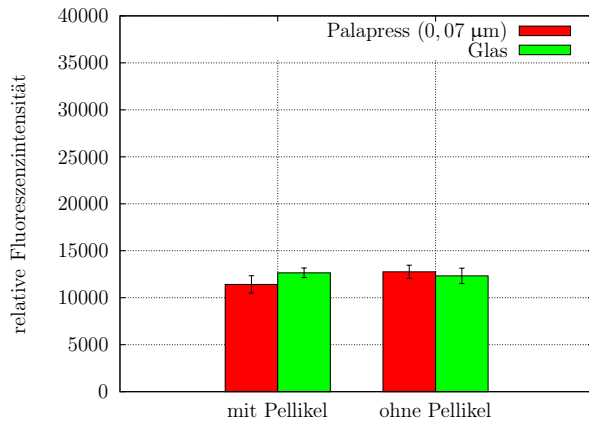
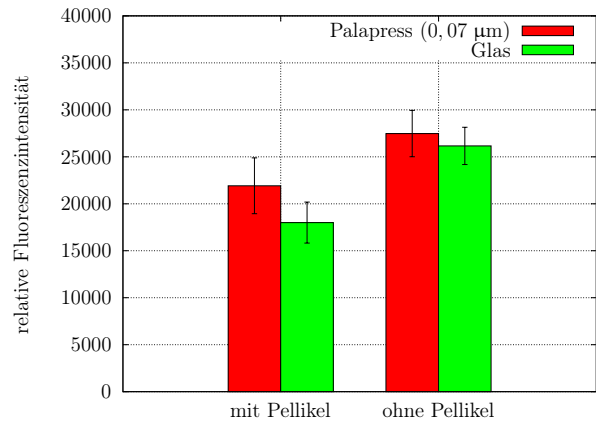


Abbildung 4.6: Adhäsion der verschiedenen Keime an Glas nach 2,5 Stunden; Vergrößerung: 1670-fach

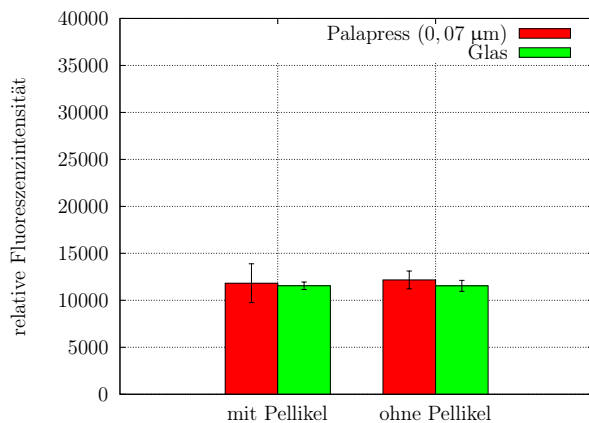
### 4.3.1.3 Vergleich der bakteriellen Adhäsion/Biofilmbildung an pellikelbedeckte und nicht pellikelbedeckte Prüfkörper



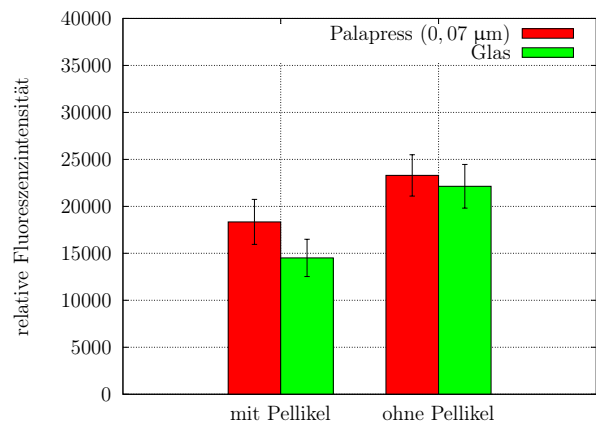
(a) Keim: DL1; Zeit: 2,5 Stunden



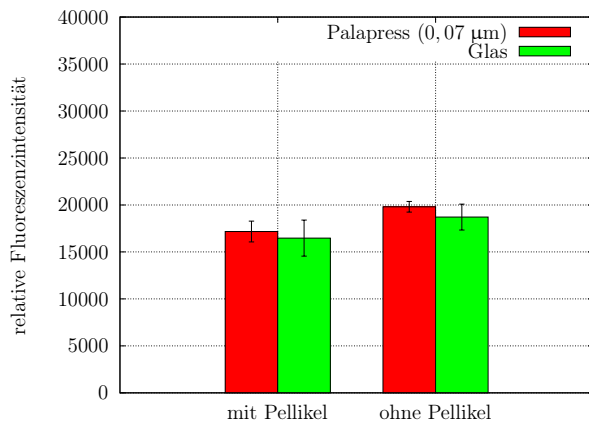
(b) Keim: T14V; Zeit: 2,5 Stunden



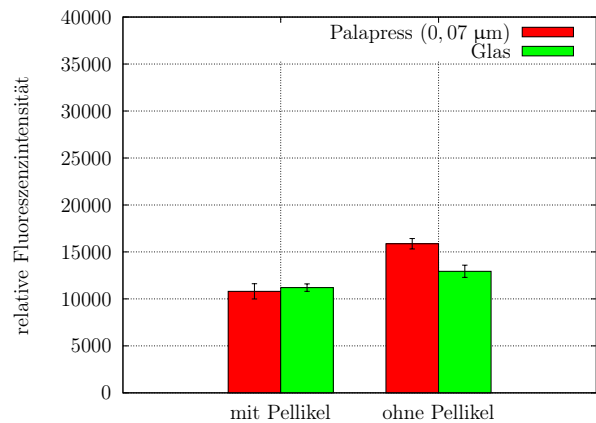
(c) Keim: DL1; Zeit: 4 Stunden



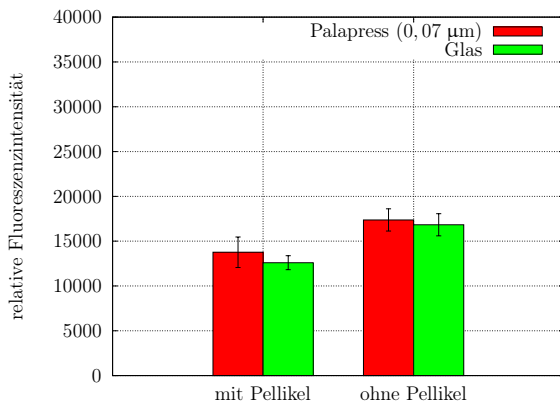
(d) Keim: T14V; Zeit: 4 Stunden



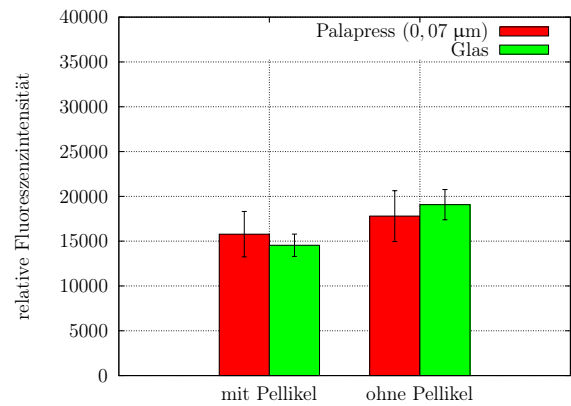
(e) Keim: DL1; Zeit: 24 Stunden



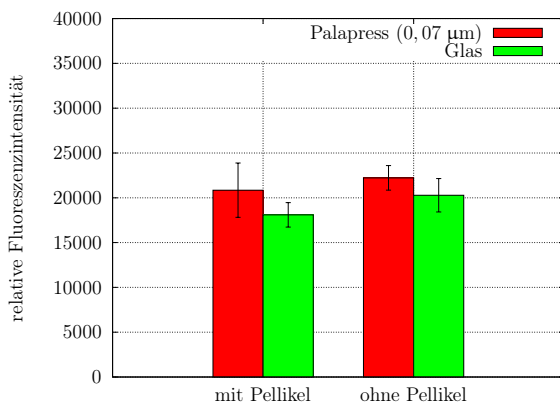
(f) Keim: T14V; Zeit: 24 Stunden



(g) Keim: beide; Zeit: 2,5 Stunden



(h) Keim: beide; Zeit: 4 Stunden



(i) Keim: beide; Zeit: 24 Stunden

Abbildung 4.7: Einfluss des Materials und der Pelikelbildung auf die relative Fluoreszenzintensität unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Es wurde statistisch untersucht, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation pellikelbedeckter Prüfkörper (+) signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation nicht pellikelbedeckter Prüfkörper (-) unterscheiden (+ ↔ -).

Tabelle 4.7 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der ANOVA sind farbig hinterlegt, wenn überzufällige Unterschiede vorliegen (vgl. Abb. 4.7).

	DL1		T14V		beide		
+ ↔ -	0,002	0,305	0,000	0,000	0,000	0,000	2,5
	0,630	0,977	0,000	0,000	0,111	0,000	4
	0,000	0,008	0,000	0,000	0,208	0,008	24
	P	G	P	G	P	G	

= + < -

Tabelle 4.7: Statistische Auswertung zum Vergleich der Adhäsion mit und ohne Pelikelbildung; Probenanzahl  $n = 20$

Nicht-pellikelbedeckte Prüfkörper aus Palapress und Glas zeigten bei Inkubation mit T14V für alle Inkubationszeiten signifikant höhere relative Fluoreszenzintensitäten als pellikelbedeckte Prüfkörper. Bei Inkubation mit DL1 konnte dies bei Palapress nur für eine Inkubationszeit von 2,5 und 24 Stunden, bei Glas nur für eine Inkubationszeit von 24 Stunden festgestellt werden. Die Ko-Inkubation mit beiden Keimen führte bei nicht-pellikelbedecktem Glas bei allen Inkubationszeiten, bei nicht-pellikelbedeckten Prüfkörpern aus Palapress nur für eine Inkubationszeit von 2,5 Stunden zu signifikant höheren relativen Fluoreszenzintensitäten als die Inkubation der entsprechenden pellikelbedeckten Prüfkörper.

### Schlussfolgerung:

Da eine hohe relative Fluoreszenzintensität mit einer hohen Anzahl an adhärenenten Zellen korreliert, lassen die Ergebnisse der statistischen Auswertung darauf schließen, dass die Anwesenheit einer Pellikel die Adhäsion der untersuchten Keime reduzierte.

Dieses Ergebnis wird auch durch die rasterelektronenmikroskopische Analyse gestützt. Beispielfhaft sind in Abbildung 4.8 Oberflächen von Prüfkörpern aus Glas gezeigt, die 2,5 Stunden mit beiden Keimen inkubiert worden waren. Bei dem in Abbildung (a) gezeigten Prüfkörper war vor der 2,5 stündigen Inkubation mit DL1 und T14V die Bildung einer Pellikel simuliert worden, bei dem in Abbildung (b) gezeigten nicht; bei (b) sind mehr und enger zusammenliegende Zellen zu erkennen als bei (a).

In Kapitel 5.2.2 wird der Einfluss der Pellikel auf die Biofilmbildung detailliert diskutiert.

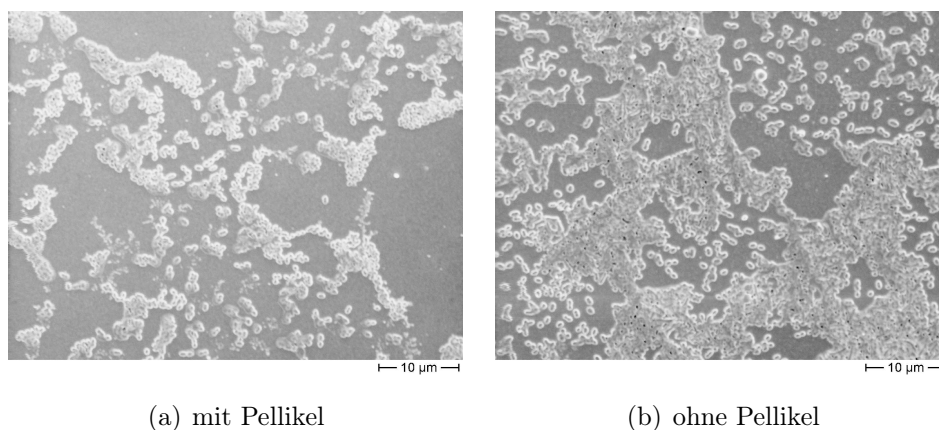


Abbildung 4.8: Adhäsion von DL1 und T14V an pellikelbedecktes und nicht pellikelbedecktes Glas nach 2,5 Stunden; Vergrößerung: 1670-fach



#### 4.3.1.4 Vergleich der bakteriellen Adhäsion/Biofilmbildung an Palapress und Glas

Es wurde statistisch untersucht, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Palapress (P) signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Glas (G) unterscheiden ( $P \leftrightarrow G$ ).

Tabelle 4.8 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der ANOVA sind farbig hinterlegt, wenn überzufällige Unterschiede vorliegen. Die verschiedenen Farben zeigen an, bei welchem Material sich im Einzelfall eine höhere relative Fluoreszenzintensität zeigte (vgl. Abb. 4.3, Abb. 4.5 und Abb. 4.7).

	2,5			4			24			
P $\leftrightarrow$ G	0,002	0,003	0,064	0,688	0,001	0,183	0,332	0,179	0,017	+
	0,224	0,205	0,345	0,091	0,267	0,236	0,032	0,000	0,016	-
	DL1	T14V	beide	DL1	T14V	beide	DL1	T14V	beide	

	=	P < G
	=	G < P

Tabelle 4.8: Statistische Auswertung zum Vergleich der bakteriellen Adhäsion/Biofilmbildung an Palapress und Glas; Probenanzahl  $n = 20$

Bei Inkubation von Prüfkörpern aus Palapress konnten signifikant höhere relative Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden als bei der Inkubation des Referenzmaterials, wenn nach vorhergehender Pellikelbildung eine Inkubation mit T14V für Inkubationszeiten von 2,5 und 4 Stunden oder eine Ko-Inkubation mit beiden Keimen für eine Inkubationszeit von 24 Stunden erfolgte. Ohne die Simulation der Pellikelbildung konnte nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden sowohl bei Inkubation mit DL1 als auch bei Inkubation mit T14V und bei Ko-Inkubation mit beiden Keimen festgestellt werden, dass Palapress signifikant höhere relative Fluoreszenzintensitäten aufwies als Glas. Bei 2,5-stündiger Inkubation pellikelbedeckter Prüfkörper mit DL1 wies Palapress signifikant niedrigere relative Fluoreszenzintensitäten auf als Glas.

#### Schlussfolgerung:

Die relative Fluoreszenzintensität korreliert mit der Anzahl an adhärenenten Zellen und so lassen die Ergebnisse der statistischen Auswertung darauf schließen, dass sich die Adhäsion der untersuchten Keime an Palapress und Glas nur wenig unterschied. In den Fällen, in denen ein signifikanter Unterschied bestand, adhärirten sie jedoch an Palapress in größerer Zahl.

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse steht in Übereinstimmung mit diesem Ergebnis. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 4.9 die Oberflächen eines Prüfkörpers aus Glas (a) und aus Palapress (b) gezeigt, die ohne vorherige Pellikelbildung für 24 Stunden mit T14V inkubiert worden waren; im Vergleich ist auf Palapress eine stärkere Biofilmbildung zu erkennen als auf Glas.

In Kapitel 5.2.4 wird der Einfluss der Materialchemie auf die Biofilmbildung detailliert diskutiert.

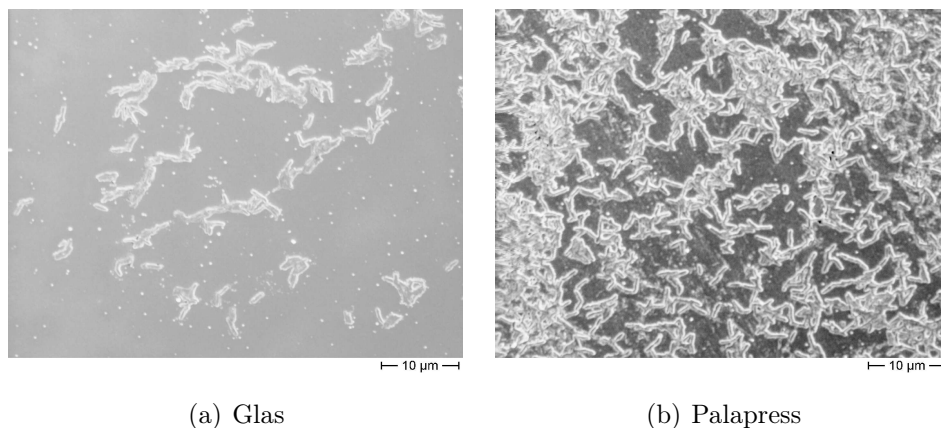


Abbildung 4.9: Biofilmbildung von T14V an Glas und Palapress nach 24 Stunden; Vergrößerung: 1620-fach

### 4.3.2 Versuchsreihe ②

In Versuchsreihe ② wurde untersucht, wie sich verschiedene Oberflächenrauigkeiten der Prüfkörper, das Material, aus dem die Prüfkörper gefertigt waren, die Inkubation mit verschiedenen Keimen und die Anwesenheit einer Pellikelschicht auf die Kolonisierung der Prüfkörper auswirken.

Dazu wurden Prüfkörper aus glattem Palapress (mittlere Rauigkeit:  $0,07 \mu\text{m}$ ), rauem Palapress (mittlere Rauigkeit:  $0,42 \mu\text{m}$  bei Variante ①a,  $0,65 \mu\text{m}$  bei Variante ①b) und einem Referenzmaterial (Glas) nach Inkubation mit Speichel bzw. PBS für 2,5 Stunden mit DL1 bzw. T14V bzw. beiden Keimen inkubiert (siehe Tab. 3.2).

Tabellen 4.9 und 4.10 geben die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten wieder (gerundete Mittelwerte; Messung bei Gain 2000):

	DL1	T14V	beide	
$P_g$	11316	18716	15238	+
$P_r$	11138	18013	14828	
G	11221	14205	13680	
$P_g$	12419	25230	19124	-
$P_r$	12818	24352	19518	
G	11959	25440	18013	

$P_g$  = Palapress glatt

$P_r$  = Palapress rau

G = Glas

+ = mit Pellikel

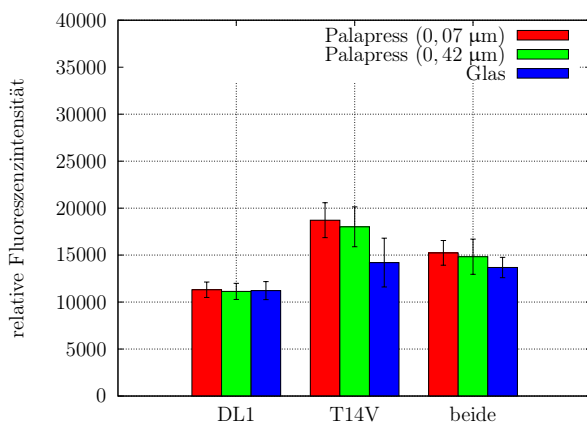
– = ohne Pellikel

Tabelle 4.9: Relative Fluoreszenzintensitäten, Variante (a)

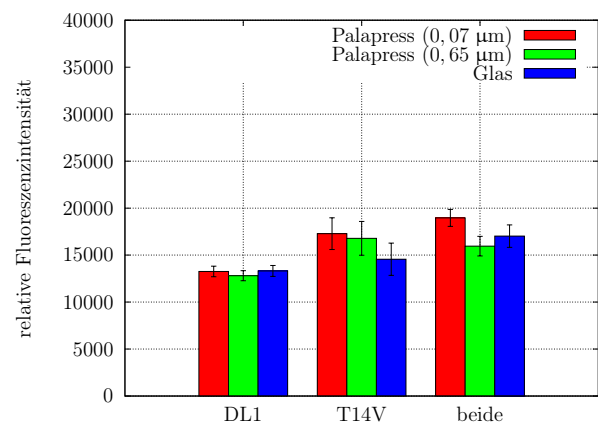
	DL1	T14V	beide	
$P_g$	13259	17282	18961	+
$P_r$	12809	16783	15954	
G	13316	14561	17020	
$P_g$	15065	25301	21521	-
$P_r$	15082	23534	20032	
G	13366	23497	21822	

Tabelle 4.10: Relative Fluoreszenzintensitäten, Variante (b)

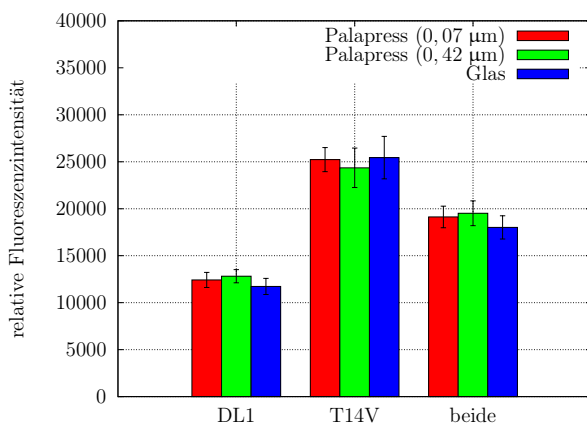
#### 4.3.2.1 Vergleich der bakteriellen Adhäsion an glattes und raues Palapress



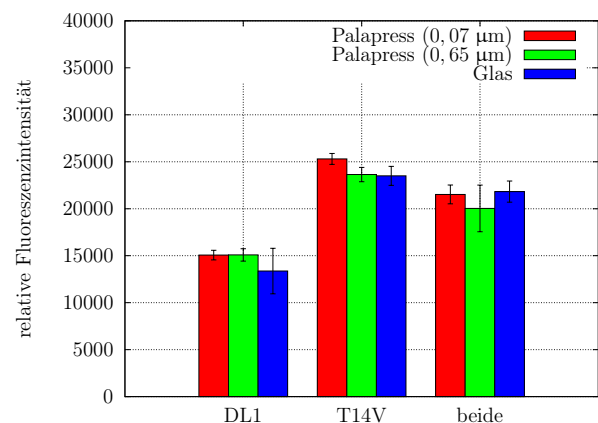
(a) Variante (a); mit Pellikel



(b) Variante (b); mit Pellikel



(c) Variante (a); ohne Pellikel



(d) Variante (b); ohne Pellikel

Abbildung 4.10: Einfluss des Materials bzw. der Oberflächenrauigkeit und des Keims auf die relative Fluoreszenzintensität unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Es wurde statistisch untersucht, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörper aus glattem Palapress ( $P_g$ ) signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörper aus rauem Palapress ( $P_r$ ) bzw. Glas (G) unterscheiden und ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörper aus rauem Palapress signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörper aus Glas unterscheiden ( $P_g \leftrightarrow P_r$ ,  $P_g \leftrightarrow G$ ,  $P_r \leftrightarrow G$ ).

Tabellen 4.11 und 4.12 geben einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) und der Post-Hoc-Tests (Games-Howell,  $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der Signifikanztests sind rot markiert (ANOVA) bzw. farbig hinterlegt (Post-Hoc), wenn überzufällige Unterschiede vorliegen. Die verschiedenen Farben zeigen an, bei welchem Material im Einzelfall eine höhere relative Fluoreszenzintensität festgestellt wurde (vgl. Abb. 4.10 und Abb. 4.13).

	DL1	T14V	beide	
ANOVA	0,903	0,000	0,064	+
$P_g \leftrightarrow P_r$	0,884	0,716	0,840	
$P_g \leftrightarrow G$	0,970	0,001	0,260	
$P_r \leftrightarrow G$	0,977	0,006	0,247	
ANOVA	0,015	0,443	0,031	-
$P_g \leftrightarrow P_r$	0,479	0,539	0,760	
$P_g \leftrightarrow G$	0,177	0,965	0,122	
$P_r \leftrightarrow G$	0,016	0,535	0,043	

Tabelle 4.11: Variante ①; statistische Auswertung zum Vergleich der Adhäsion an glattes und rauhes Palapress; Probenanzahl  $n = 30$

	=	$P_r < P_g$
	=	$G < P_{r/g}$

	DL1	T14V	beide	
ANOVA	0,103	0,004	0,000	+
$P_g \leftrightarrow P_r$	0,185	0,800	0,000	
$P_g \leftrightarrow G$	0,973	0,006	0,002	
$P_r \leftrightarrow G$	0,133	0,029	0,113	
ANOVA	0,122	0,000	0,054	-
$P_g \leftrightarrow P_r$	0,998	0,000	0,226	
$P_g \leftrightarrow G$	0,126	0,001	0,804	
$P_r \leftrightarrow G$	0,126	0,939	0,135	

Tabelle 4.12: Variante ②; statistische Auswertung zum Vergleich der Adhäsion an glattes und rauhes Palapress; Probenanzahl  $n = 30$

Bei Variante ① konnten zwischen den relativen Fluoreszenzintensitäten, die bei Inkubation von Prüfkörpern aus glattem Palapress gemessen wurden, und den relativen Fluoreszenzintensitäten, die bei Inkubation von Prüfkörpern aus rauem Palapress gemessen wurden, keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei Variante ② zeigten die relativen Fluoreszenzintensitäten für Prüfkörper aus glattem Palapress bei Ko-Inkubation mit beiden Keimen mit vorheriger Pellikelbildung und bei Inkubation mit T14V ohne vorherige Pellikelbildung signifikant höhere Werte als für Prüfkörper aus rauem Palapress. Bei Variante ① und Variante

ⓑ führte die Inkubation von Prüfkörpern aus Glas mit T14V nach vorheriger Pellikelbildung sowohl gegenüber Prüfkörpern aus glattem als auch gegenüber Prüfkörpern aus rauem Palapress zu signifikant niedrigeren relativen Fluoreszenzintensitäten. Weiterhin zeigten die relativen Fluoreszenzintensitäten für Prüfkörper aus Glas bei Variante ⓐ signifikant niedrigere Werte als für Prüfkörper aus rauem Palapress, wenn diese ohne vorherige Pellikelbildung mit DL1 oder beiden Keimen (ko-)inkubiert worden waren; bei Variante ⓑ wurden bei Inkubation mit T14V ohne vorherige Pellikelbildung und bei Ko-Inkubation mit beiden Keimen nach erfolgter Pellikelbildung für Prüfkörper aus Glas signifikant geringere relative Fluoreszenzintensitäten gemessen als für Prüfkörper aus glattem Palapress.

#### Schlussfolgerung:

Aufgrund der Korrelation der relativen Fluoreszenzintensität mit der Anzahl adhärenter Zellen, lassen die Ergebnisse der statistischen Auswertung darauf schließen, dass sich die unterschiedlichen Rauigkeiten der Prüfkörper aus Palapress wenig auf die Adhäsion der untersuchten Keime auswirkten.

Dies wird auch von der rasterelektronenmikroskopischen Analyse bestätigt. Beispielhaft sind in Abbildung 4.11 die Oberflächen je eines Prüfkörpers aus glattem (a) und rauem Palapress (b) gezeigt, die nach vorheriger Pellikelbildung mit DL1 und T14V inkubiert worden waren; die Adhäsion der untersuchten Keime ist auf beiden Oberflächen ähnlich stark ausgeprägt. In Kapitel 5.2.3 wird der Einfluss der Oberflächenrauigkeit auf die Adhäsion von Mikroorganismen detailliert diskutiert.

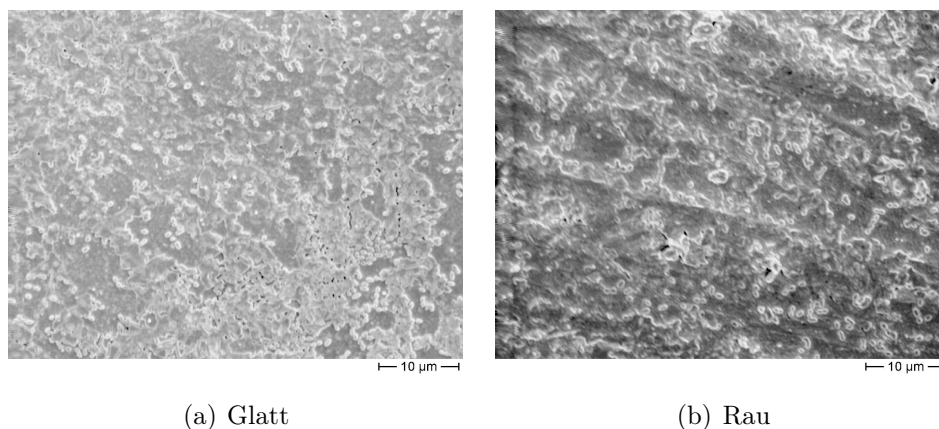


Abbildung 4.11: Adhäsion von DL1 und T14V an glattes und raues Palapress nach 2,5 Stunden; Vergrößerung: 1670-fach

#### 4.3.2.2 Adhäsion der verschiedenen Keime im Vergleich

Es wurde statistisch untersucht, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper mit DL1 signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper mit T14V bzw. beiden Keimen unterschieden und ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper mit T14V signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper mit beiden Keimen unterschieden (DL1  $\leftrightarrow$  T14V, DL1  $\leftrightarrow$  beide, T14V  $\leftrightarrow$  beide).

Tabellen 4.13 und 4.14 geben einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) und der Post-Hoc-Tests (Games-Howell,  $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der Signifikanztests sind rot markiert (ANOVA) bzw. farbig hinterlegt (Post-Hoc), wenn überzufällige Unterschiede vorliegen. Die verschiedenen Farben zeigen an, bei welchem Keim im Einzelfall eine höhere relative Fluoreszenzintensität festgestellt wurde (vgl. Abb. 4.10).

	P <sub>g</sub>	P <sub>r</sub>	G	
ANOVA	0,000	0,001	0,001	+
DL1 $\leftrightarrow$ T14V	0,000	0,000	0,014	
DL1 $\leftrightarrow$ beide	0,000	0,000	0,000	
T14V $\leftrightarrow$ beide	0,001	0,006	0,828	
ANOVA	0,000	0,000	0,000	-
DL1 $\leftrightarrow$ T14V	0,000	0,000	0,000	
DL1 $\leftrightarrow$ beide	0,000	0,000	0,000	
T14V $\leftrightarrow$ beide	0,000	0,000	0,000	

Tabelle 4.13: Variante ⑤a; statistische Auswertung zum Vergleich der Adhäsion der verschiedenen Keime; Probenanzahl n = 30

	P <sub>g</sub>	P <sub>r</sub>	G	
ANOVA	0,000	0,000	0,000	+
DL1 $\leftrightarrow$ T14V	0,000	0,000	0,121	
DL1 $\leftrightarrow$ beide	0,000	0,000	0,000	
T14V $\leftrightarrow$ beide	0,038	0,439	0,005	
ANOVA	0,000	0,000	0,000	-
DL1 $\leftrightarrow$ T14V	0,000	0,000	0,000	
DL1 $\leftrightarrow$ beide	0,000	0,000	0,000	
T14V $\leftrightarrow$ beide	0,000	0,003	0,007	

Tabelle 4.14: Variante ⑤b; statistische Auswertung zum Vergleich der Adhäsion der verschiedenen Keime; Probenanzahl n = 30

	= DL1 < beide < T14V
	= T14V < beide

Die Inkubation von Prüfkörpern aus Palapress mit DL1 führte bei beiden Varianten zu signifikant niedrigeren relativen Fluoreszenzintensitäten als die Inkubation mit T14V und die Ko-Inkubation mit beiden Keimen. Bei Inkubation der Prüfkörper aus Palapress mit T14V zeigten sich außer bei den pellikelbedeckten Prüfkörpern aus Variante ⑤b höhere relative Fluoreszenzintensitäten als bei Ko-Inkubation mit beiden Keimen. Die Inkubation des Referenzmaterials führte abgesehen von zwei Fällen, in denen keine signifikanten Unterschiede zwischen den

relativen Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden konnten (siehe Tab. 4.13 und Tab. 4.14), zu denselben Ergebnissen.

#### Schlussfolgerung:

Unter Beachtung der Korrelation zwischen einer hohen relativen Fluoreszenzintensität und einer großen Zahl an adhärennten Zellen lassen die Ergebnisse der statistischen Auswertung darauf schließen, dass die untersuchten Keime unabhängig von der Rauigkeit unterschiedlich häufig adhärierten. Das Ergebnis aus Versuchsreihe ① ( $DL1 < \text{beide} < T14V$  bei einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden) wird bestätigt.

Auch die rasterelektronenmikroskopische Analyse stimmt mit diesem Ergebnis überein. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 4.12 die Oberflächen von Prüfkörpern aus glattem Palapress gezeigt, die nach Pellikelbildung mit DL1 (a), T14V (c) bzw. beiden Keimen (b) inkubiert worden waren; während bei (a) wenige Kokken zu erkennen sind, zeigen sich in (c) dicht zusammenliegende Stäbchen.

In Kapitel 5.2.1 wird der Zusammenhang zwischen Inkubationszeit/Keim und Biofilmbildung detailliert diskutiert.

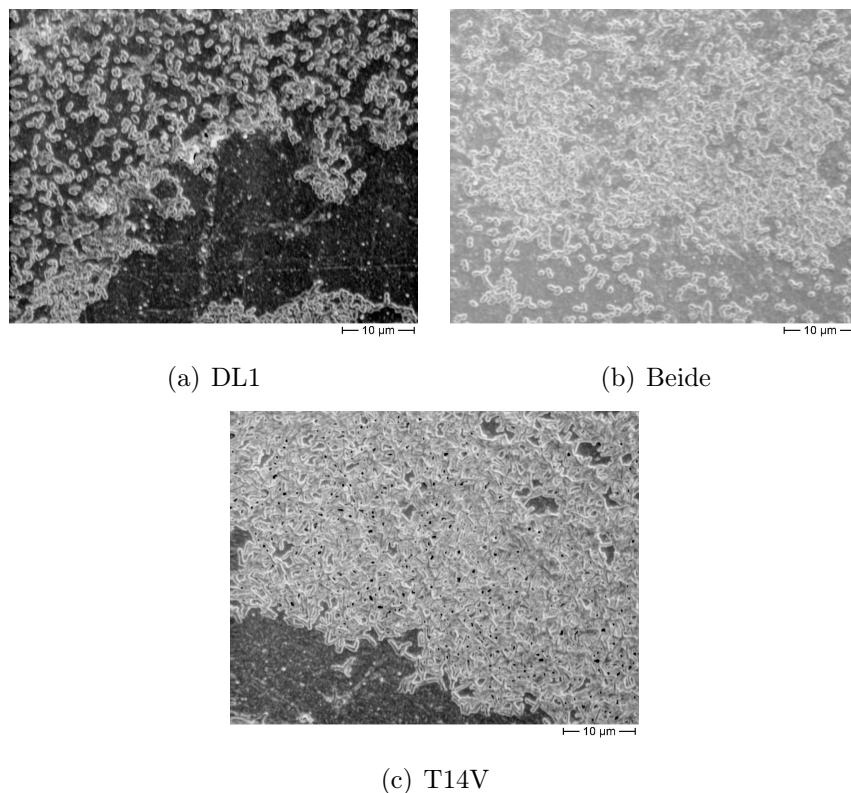
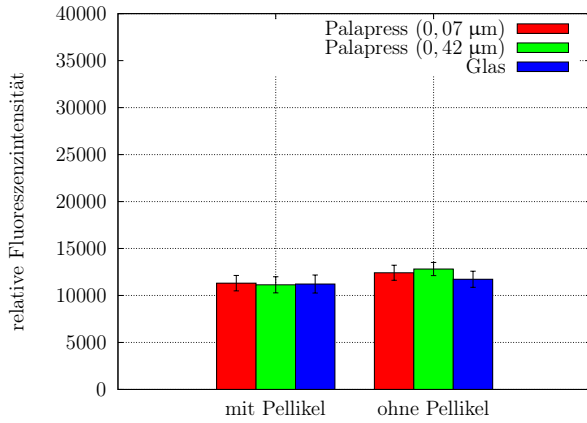
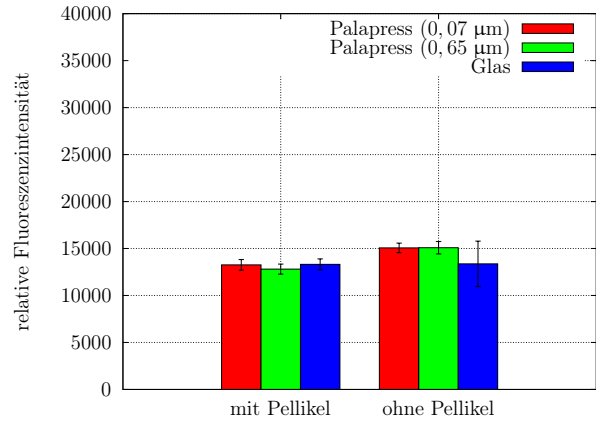


Abbildung 4.12: Adhäsion der verschiedenen Keime an glattes Palapress nach 2,5 Stunden; Vergrößerung: 1670-fach

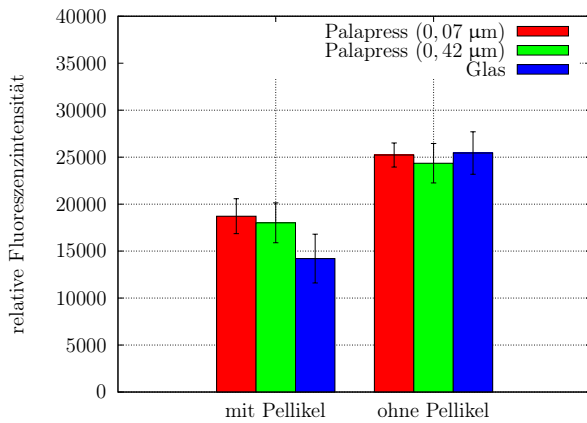
### 4.3.2.3 Vergleich der bakteriellen Adhäsion an pellikelbedeckte und nicht pellikelbedeckte Prüfkörper



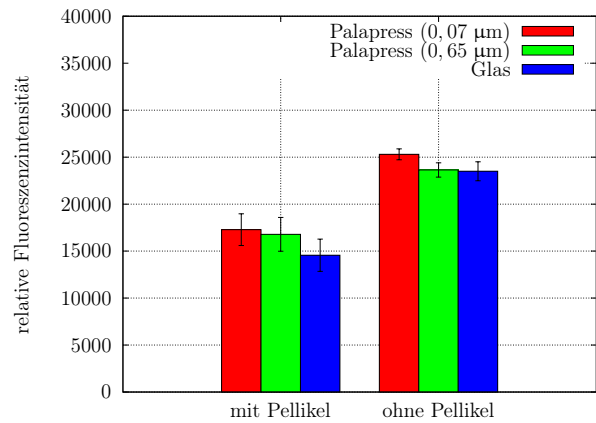
(a) Variante ①; Keim: DL1



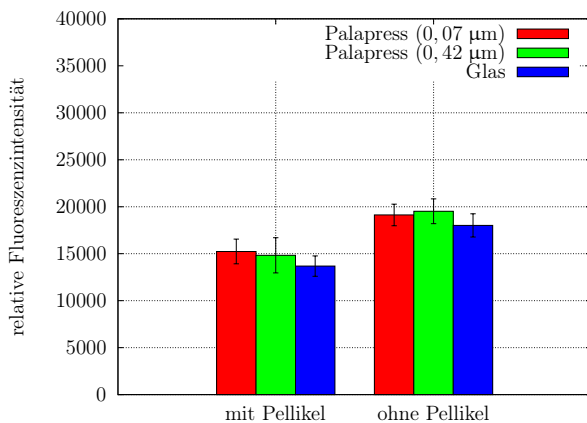
(b) Variante ②; Keim: DL1



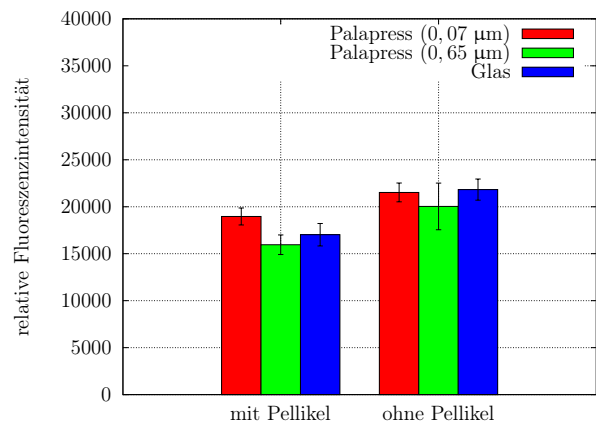
(c) Variante ①; Keim: T14V



(d) Variante ②; Keim: T14V



(e) Variante ①; Keim: beide



(f) Variante ②; Keim: beide

Abbildung 4.13: Einfluss des Materials bzw. der Oberflächenrauigkeit und der Pellikelbildung auf die relative Fluoreszenzintensität unter verschiedenen Inkubationsbedingungen



Es wurde statistisch untersucht, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation pellikelbedeckter Prüfkörper (+) signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation nicht pellikelbedeckter Prüfkörper (-) unterscheiden ( $+ \leftrightarrow -$ ).

Tabelle 4.15 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der ANOVA sind farbig hinterlegt, wenn überzufällige Unterschiede vorliegen (vgl. Abb. 4.13).

	DL1			T14V			beide			
$+ \leftrightarrow -$	0,007	0,000	0,233	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Ⓐ
	0,000	0,000	0,951	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Ⓑ
	$P_g$	$P_r$	G	$P_g$	$P_r$	G	$P_g$	$P_r$	G	

 =  $+ < -$

Tabelle 4.15: Statistische Auswertung zum Vergleich der Adhäsion mit und ohne Pellikelbildung; Probenanzahl  $n = 20$

Die Inkubation pellikelbedeckter Prüfkörper aus Palapress führte in allen Fällen zu signifikant niedrigeren relativen Fluoreszenzintensitäten als die Inkubation nicht pellikelbedeckter Prüfkörper aus Palapress. Dies war auch für das Referenzmaterial Glas der Fall – abgesehen von der Inkubation mit DL1. Bei dieser konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den relativen Fluoreszenzintensitäten, die bei Inkubation von pellikelbedecktem Glas gemessen wurden und den relativen Fluoreszenzintensitäten, die bei Inkubation von nicht pellikelbedecktem Glas gemessen wurden, festgestellt werden.

#### Schlussfolgerung:

Da eine Korrelation zwischen einer hohen relativen Fluoreszenzintensität und einer hohen Anzahl an adhärenenten Zellen besteht, können die Ergebnisse der statistischen Auswertung so gedeutet werden, dass die Anwesenheit einer Pellikel die Adhäsion der untersuchten Keime reduzierte.

Auch von der rasterelektronenmikroskopischen Analyse wird diese Schlussfolgerung unterstützt. Beispielhaft sind in Abbildung 4.14 Oberflächen von Prüfkörpern aus rauem Palapress gezeigt, die nach (a) bzw. ohne (b) Bildung einer Pellikel mit DL1 inkubiert worden waren; bei (b) sind vergleichsweise dichter zusammenliegende Kokken zu erkennen.

In Kapitel 5.2.2 wird der Einfluss der Pellikel auf die Adhäsion von Mikroorganismen detailliert diskutiert.

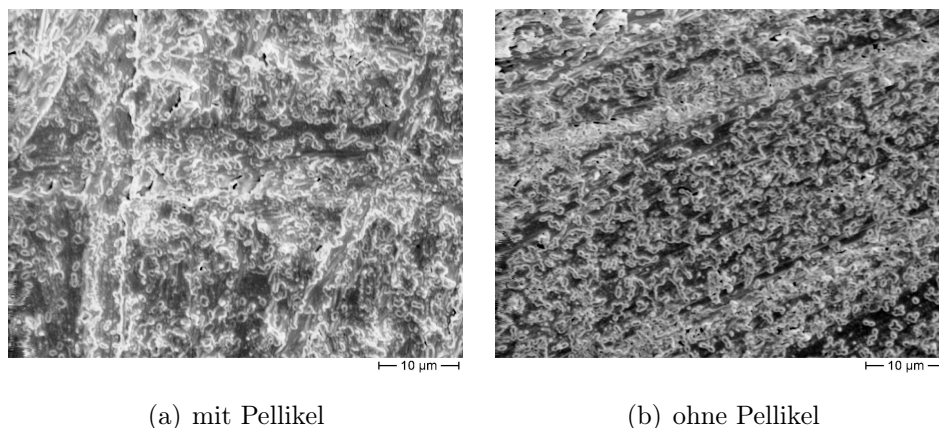


Abbildung 4.14: Adhäsion von DL1 an pellikelbedecktes und nicht pellikelbedecktes raues Palapress nach 2,5 Stunden; Vergrößerung: 1670-fach

### 4.3.3 Versuchsreihe ③

In Versuchsreihe ③ wurde untersucht, wie sich verschiedene Materialien, aus denen die Prüfkörper gefertigt waren, die Inkubation mit verschiedenen Keimen und die Anwesenheit einer Pellikelschicht auf die Kolonisierung der Prüfkörper auswirken.

Dazu wurden Prüfkörper aus Empress (mittlere Rauigkeit:  $0,06\text{ }\mu\text{m}$ ), Sinfony (mittlere Rauigkeit:  $0,04\text{ }\mu\text{m}$ ) und Girobond (mittlere Rauigkeit:  $0,06\text{ }\mu\text{m}$ ) im Anschluss an die Inkubation mit Speichel bzw. PBS für vier Stunden mit DL1 bzw. T14V bzw. beiden Keimen inkubiert (siehe Tab. 3.3).

Tabelle 4.16 gibt die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten wieder (gerundete Mittelwerte; Messung bei Gain 1800):

	DL1	T14V	beide	
E	8553	9955	11814	+
S	9962	16287	13410	
G	9444	11436	13303	
E	8186	17799	18809	-
S	9836	28905	21226	
G	8935	27834	22234	

E = Empress  
 S = Sinfony  
 G = Girobond  
 + = mit Pellikel  
 - = ohne Pellikel

Tabelle 4.16: Relative Fluoreszenzintensitäten

#### 4.3.3.1 Vergleich der bakteriellen Adhäsion an Empress, Sinfony und Girobond

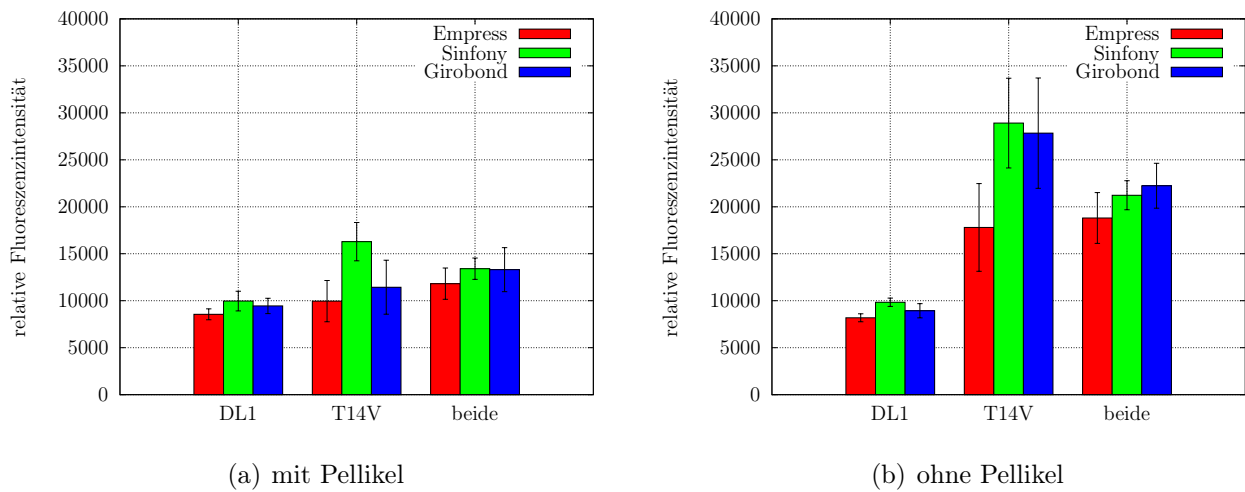


Abbildung 4.15: Einfluss des Materials und des Keims auf die relative Fluoreszenzintensität unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Es wurde statistisch untersucht, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörper aus Empress (E) signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörper aus Sinfony (S) bzw. Girobond (G) unterscheiden und ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörper aus Sinfony signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörper aus Girobond unterscheiden ( $E \leftrightarrow S$ ,  $E \leftrightarrow G$ ,  $S \leftrightarrow G$ ).

Tabelle 4.17 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) und der Post-Hoc-Tests (Games-Howell,  $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der Signifikanztests sind rot markiert (ANOVA) bzw. farbig hinterlegt (Post-Hoc), wenn überzufällige Unterschiede vorliegen (vgl. Abb. 4.15 und Abb. 4.18).

	DL1	T14V	beide	DL1	T14V	beide
ANOVA	0,003	0,000	0,101	0,000	0,000	0,007
$E \leftrightarrow S$	0,006	0,000	0,058	0,000	0,000	0,067
$E \leftrightarrow G$	0,032	0,417	0,259	0,040	0,002	0,020
$S \leftrightarrow G$	0,450	0,001	0,991	0,015	0,896	0,516
	+			-		

=  $E < G < S$

Tabelle 4.17: Statistische Auswertung zum Vergleich der Adhäsion an Empress, Sinfony und Girobond; Probenanzahl  $n = 30$

Die Inkubation von Prüfkörpern aus Empress mit DL1 bzw. T14V führte zu signifikant niedrigeren relativen Fluoreszenzintensitäten als die Inkubation von Prüfkörpern aus Sinfony. Wenn die Prüfkörper im Anschluss an die Inkubation mit Speichel mit DL1 inkubiert worden waren, zeigten sich für Prüfkörper aus Empress signifikant niedrigere relative Fluoreszenzintensitäten als für Girobond. Ohne Inkubation mit Speichel war dies sowohl bei Inkubation mit DL1 als auch bei Inkubation mit T14V und bei Ko-Inkubation mit beiden Keimen der Fall. Die Inkubation mit Speichel und anschließende Inkubation mit T14V führte bei Prüfkörpern aus Sinfony zu signifikant höheren relativen Fluoreszenzintensitäten als bei Prüfkörpern aus Girobond. Auch bei Inkubation mit DL1 ohne vorherige Bildung einer Pelikel zeigten sich für Prüfkörper aus Sinfony signifikant höhere relative Fluoreszenzintensitäten als für Prüfkörper aus Girobond.

#### Schlussfolgerung:

Aufgrund der positiven Korrelation zwischen der Höhe der relativen Fluoreszenzintensität und der Anzahl adhärenter Zellen, lassen die Ergebnisse der statistischen Auswertung darauf schließen, dass die verschiedenen Materialien von den untersuchten Keimen unterschiedlich stark kolonisiert wurden, wobei die Adhäsion der Testkeime an Empress am geringsten und an Sinfony am höchsten ausfiel.

Dies wird auch durch die rasterelektronenmikroskopische Analyse bestätigt. Beispielhaft sind in Abbildung 4.16 die Oberflächen von Prüfkörpern aus Empress (a), Girobond (b) und Sinfony (c) gezeigt, die ohne vorhergehende Inkubation mit Speichel mit DL1 inkubiert worden waren; bei (a) sind wenige Kokken zu erkennen, während diese bei (c) dicht zusammenliegen.

In Kapitel 5.2.4 wird der Einfluss der Materialchemie auf die Adhäsion von Mikroorganismen detailliert diskutiert.

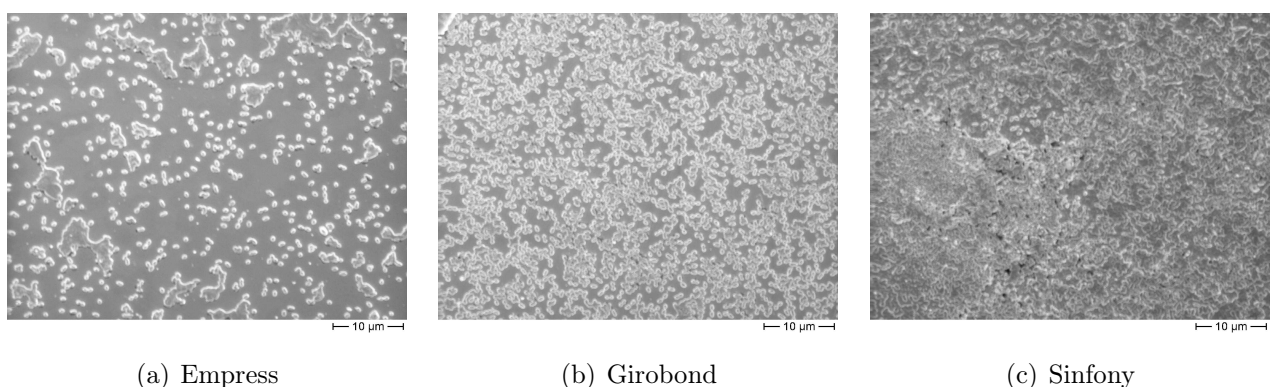


Abbildung 4.16: Adhäsion von DL1 an Empress, Girobond und Sinfony nach 4 Stunden; Vergrößerung: 1670-fach

#### 4.3.3.2 Adhäsion der verschiedenen Keime im Vergleich

Es wurde statistisch untersucht, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper mit DL1 signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper mit T14V bzw. beiden Keimen unterschieden und ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper mit T14V signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation der Prüfkörper mit beiden Keimen unterschieden (DL1 ↔ T14V, DL1 ↔ beide, T14V ↔ beide).

Tabelle 4.18 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) und der Post-Hoc-Tests (Games-Howell,  $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der Signifikanztests sind rot markiert (ANOVA) bzw. farbig hinterlegt (Post-Hoc), wenn überzufällige Unterschiede vorliegen (vgl. Abb. 4.15).

	E	S	G	E	S	G
ANOVA	0,001	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
DL1 ↔ T14V	0,173	0,000	0,136	0,000	0,000	0,000
DL1 ↔ beide	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
T14V ↔ beide	0,113	0,004	0,276	0,827	0,001	0,040
	+			-		


 = DL1 < beide < T14V

Tabelle 4.18: Statistische Auswertung zum Vergleich der Adhäsion der verschiedenen Keime; Probenanzahl  $n = 30$

Die Inkubation von pellicelbedeckten Prüfkörpern aus Sinfony mit DL1 führte zu signifikant niedrigeren relativen Fluoreszenzintensitäten als die Ko-Inkubation mit beiden Keimen und diese wiederum zu signifikant geringeren relativen Fluoreszenzintensitäten als die Inkubation mit T14V. Desweiteren führte die Inkubation mit T14V im Vergleich zur Ko-Inkubation mit beiden Keimen bei Inkubation von nicht pellicelbedeckten Prüfkörpern aus Sinfony und Girobond zu signifikant höheren relativen Fluoreszenzintensitäten. Wenn die Prüfkörper nicht mit Speichel inkubiert worden waren, konnte bei Inkubation aller Materialien festgestellt werden, dass bei ihrer Inkubation mit DL1 niedrigere relative Fluoreszenzintensitäten auftraten als bei Inkubation mit T14V und Ko-Inkubation mit beiden Keimen. Die Inkubation mit DL1 führte auch dann zu signifikant geringeren relativen Fluoreszenzintensitäten als die Ko-Inkubation mit beiden Keimen, wenn Prüfkörper aus Empress und Girobond zunächst mit Speichel inkubiert worden waren.

**Schlussfolgerung:**

Unter Beachtung der zwischen der relativen Fluoreszenzintensität und der Anzahl an adhären-  
renten Zellen bestehenden Korrelation, können die Ergebnisse der statistischen Auswertung  
so gedeutet werden, dass die untersuchten Keime unabhängig vom Material unterschiedlich  
häufig adhärirten, wobei das Ergebnis aus Versuchsreihe ① (DL1 < beide < T14V bei einer  
Inkubationszeit von vier Stunden) bestätigt wird.

Auch die rasterelektronenmikroskopische Analyse spricht für diese Schlussfolgerung. Zur  
Veranschaulichung sind in Abbildung 4.17 die Oberflächen von Prüfkörpern aus Sinfony  
gezeigt, die mit DL1 (a) bzw. T14V (c) bzw. beiden Keimen (b) inkubiert worden waren;  
im Vergleich zu den lockerer liegenden Kokken bei (a) sind bei (c) dicht zusammengelagerte  
Stäbchen zu erkennen.

In Kapitel 5.2.1 wird der Zusammenhang zwischen Inkubationszeit/Keim und Biofilmbildung  
detailliert diskutiert.

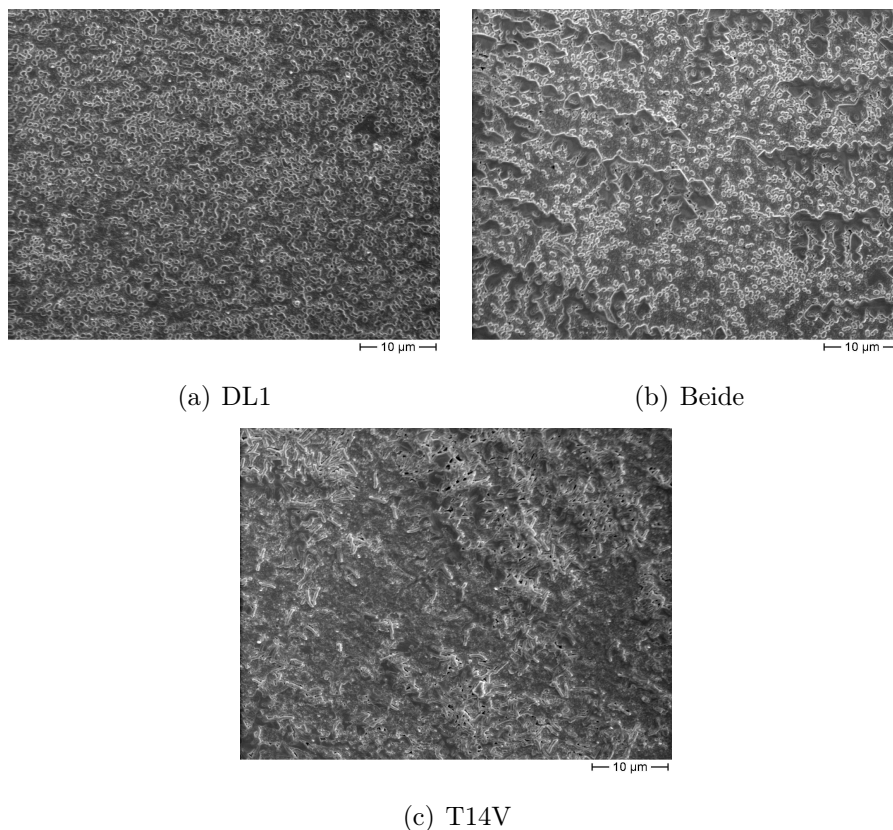
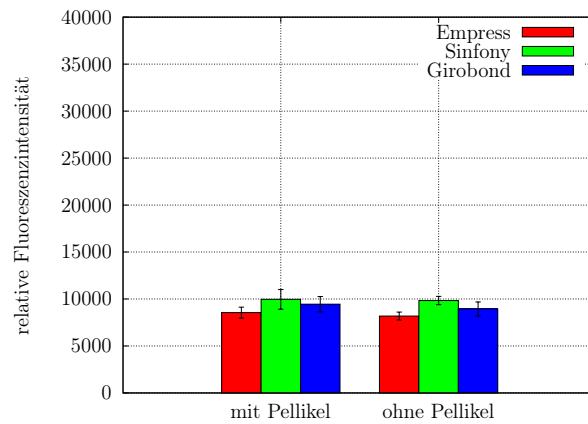
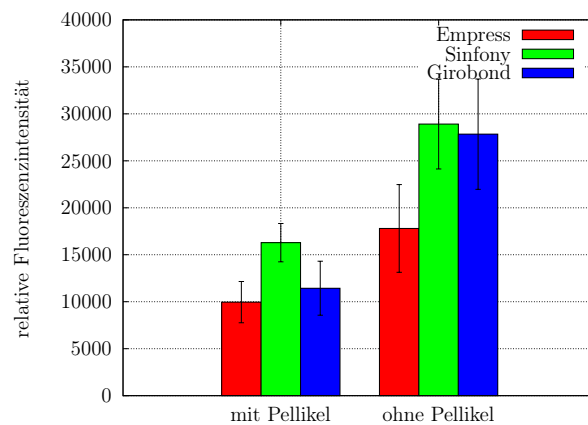


Abbildung 4.17: Adhäsion der verschiedenen Keime an Sinfony nach 4 Stunden; Vergrößerung: 1670-fach

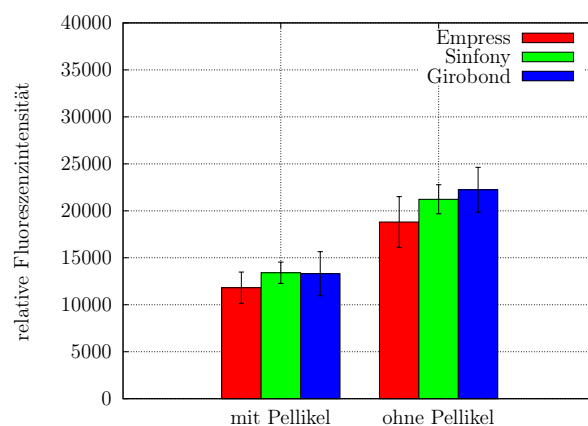
#### 4.3.3.3 Vergleich der bakteriellen Adhäsion an pellikelbedeckte und nicht pellikelbedeckte Prüfkörper



(a) Keim: DL1



(b) Keim: T14V



(c) Keim: beide

Abbildung 4.18: Einfluss des Materials und der Pellikelbildung auf die relative Fluoreszenzintensität unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Es wurde statistisch untersucht, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation pellikelbedeckter Prüfkörper (+) signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation nicht pellikelbedeckter Prüfkörper (-) unterscheiden ( $+ \leftrightarrow -$ ).

Tabelle 4.19 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der ANOVA sind farbig hinterlegt, wenn überzufällige Unterschiede vorliegen (vgl. Abb. 4.18).

	DL1			T14V			beide		
$+ \leftrightarrow -$	0,126	0,729	0,165	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	E	S	G	E	S	G	E	S	G

 =  $+ < -$

Tabelle 4.19: Statistische Auswertung zum Vergleich der Adhäsion mit und ohne Pellikelbildung; Probenanzahl  $n = 20$

Bei Inkubation mit DL1 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den relativen Fluoreszenzintensitäten, die bei Inkubation pellikelbedeckter Prüfkörper gemessen wurden, und den relativen Fluoreszenzintensitäten, die bei Inkubation nicht pellikelbedeckter Prüfkörper gemessen wurden, festgestellt werden. Die Inkubation mit T14V und die Ko-Inkubation mit beiden Keimen führte bei Prüfkörpern, die mit Speichel inkubiert worden waren, zu signifikant niedrigeren relativen Fluoreszenzintensitäten als bei Prüfkörpern, die nicht mit Speichel inkubiert worden waren.

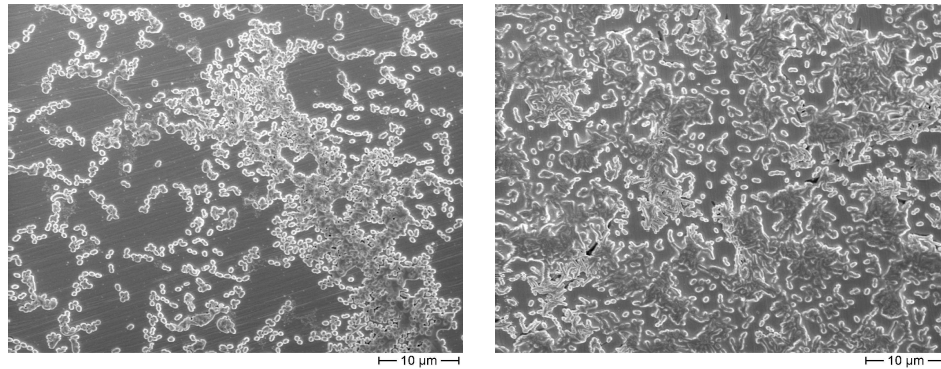
#### Schlussfolgerung:

Da eine hohe relative Fluoreszenzintensität mit einer hohen Zahl an adhärenen Zellen korreliert, lassen die Ergebnisse der statistischen Auswertung darauf schließen, dass die Adhäsion von DL1 und T14V bei Ko-Inkubation und die Adhäsion von T14V bei Inkubation als Einzelkultur durch die Anwesenheit einer Pellikel reduziert wurde, während die Adhäsion von DL1 nicht signifikant beeinflusst wurde.

Diese Wirkung der Pellikel wird auch durch die rasterelektronenmikroskopische Analyse verdeutlicht. Beispielhaft sind in Abbildung 4.19 die Oberflächen von Prüfkörpern aus Girobond gezeigt, die im Anschluss an die Inkubation mit Speichel (a) bzw. PBS (b) mit beiden Keimen inkubiert worden waren; bei (a) sind weniger Zellen zu erkennen als bei (b).

In Kapitel 5.2.2 wird der Einfluss der Pellikel auf die Adhäsion von Mikroorganismen detailliert diskutiert.





(a) mit Pellikel

(b) ohne Pellikel

Abbildung 4.19: Adhäsion von DL1 und T14V an pellikelbedecktes und nicht pellikelbedecktes Girobond nach 4 Stunden; Vergrößerung: 1670-fach

#### 4.3.4 Fließkammer

Wie in Kapitel 3.3.4.4 erläutert konnten für den Keim DL1 keine Versuche in der Fließkammer durchgeführt werden, allerdings war für den Keim T14V zuvor schon ein Versuch in der Fließkammer erfolgt. Dabei wurde untersucht, wie sich verschiedene Materialien auf die Adhäsion dieses Keims unter dynamischen Bedingungen auswirken. Prüfkörper aus Empress (mittlere Rauigkeit:  $0,06 \mu\text{m}$ ), Sinfony (mittlere Rauigkeit:  $0,04 \mu\text{m}$ ) und Girobond (mittlere Rauigkeit:  $0,06 \mu\text{m}$ ), die nicht mit Speichel inkubiert worden waren, wurden dazu vier Stunden lang mit T14V inkubiert.

Tabelle 4.20 gibt die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten wieder (gerundete Mittelwerte; Messung bei Gain 1800):

	E	S	G	
Dynamisch	5696	12159	8415	T14V, -
Semistatisch	17799	28905	27834	

E = Empress  
 S = Sinfony  
 G = Girobond  
 - = ohne Pellikel

Tabelle 4.20: Relative Fluoreszenzintensitäten Fließkammer

Abbildung 4.20 veranschaulicht die Messwerte des Fließkammerversuchs. Zudem sind die relativen Fluoreszenzintensitäten aus dem entsprechenden semistatischen Versuch gezeigt. So kann man die relativen Fluoreszenzintensitäten bei semistatischem und dynamischem Versuchsaufbau für die einzelnen Materialien direkt vergleichen.

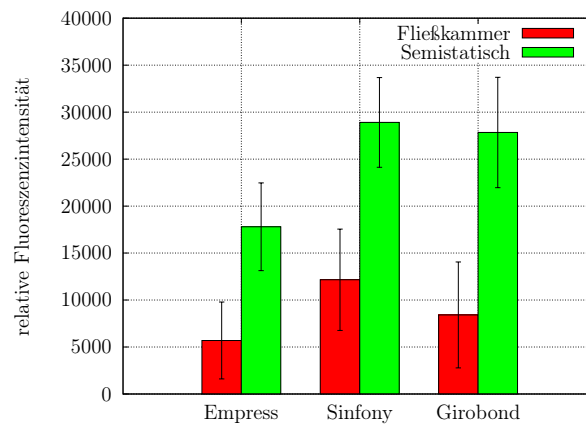


Abbildung 4.20: Einfluss des Materials auf die relative Fluoreszenzintensität bei Inkubation der Prüfkörper mit T14V unter dynamischen bzw. semistatischen Bedingungen

#### 4.3.4.1 Vergleich der bakteriellen Adhäsion an Empress, Sinfony und Girobond

Es wurde statistisch untersucht, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörper aus Empress (E) signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörper aus Sinfony (S) bzw. Girobond (G) unterscheiden und ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörper aus Sinfony signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation von Prüfkörper aus Girobond unterscheiden ( $E \leftrightarrow S$ ,  $E \leftrightarrow G$ ,  $S \leftrightarrow G$ ).

Tabelle 4.21 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) und der Post-Hoc-Tests (Games-Howell (dynamisch)/Tukey (semistatisch),  $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der Signifikanztests sind rot markiert (ANOVA) bzw. farbig hinterlegt (Post-Hoc), wenn überzufällige Unterschiede vorliegen (vgl. Abb. 4.20). Zum Vergleich sind auch die Ergebnisse der statistischen Prüfung aufgeführt, die beim entsprechenden semistatischen Versuch ermittelt wurden.

	T14V		
ANOVA	0,041	0,000	-
$E \leftrightarrow S$	0,033	0,000	
$E \leftrightarrow G$	0,503	0,002	
$S \leftrightarrow G$	0,281	0,896	
	Dynamisch	Semistatisch	

=  $E < S/G$

Tabelle 4.21: Statistische Auswertung zum Vergleich der Adhäsion von T14V an Empress, Sinfony und Girobond; Probenanzahl  $n = 9$  (dynamisch)/10 (semistatisch)

Bei beiden Verfahren zeigten sich bei Inkubation von Prüfkörpern aus Empress signifikant niedrigere relative Fluoreszenzintensitäten als bei Sinfony. Zwischen Sinfony und Girobond konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, zwischen Empress und Girobond nur beim semistatischen Vorgehen. In diesem Fall zeigten sich signifikant niedrigere relative Fluoreszenzintensitäten für Empress.

#### 4.3.4.2 Vergleich der bakteriellen Adhäsion unter dynamischen und semistatischen Bedingungen

Es wurde statistisch untersucht, ob sich die relativen Fluoreszenzintensitäten beim Versuch im Fließkammerverfahren (FK) signifikant von den relativen Fluoreszenzintensitäten beim entsprechenden Versuch im semistatischen Verfahren (Stat) unterschieden (FK  $\leftrightarrow$  Stat).

Tabelle 4.22 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ). Die Ergebnisse der ANOVA sind farbig hinterlegt, wenn überzufällige Unterschiede vorliegen (vgl. Abb. 4.20).

	E	S	G	
FK $\leftrightarrow$ Stat	0,000	0,000	0,000	T14V, -


 = FK < Stat

Tabelle 4.22: Statistische Auswertung zum Vergleich der Adhäsion von T14V im Fließkammerverfahren und im semistatischen Verfahren; Probenanzahl  $n = 9$  (FK)/10 (Stat)

Die relativen Fluoreszenzintensitäten waren bei Inkubation unter semistatischen Bedingungen in allen Fällen signifikant höher als bei Inkubation unter dynamischen Bedingungen.

#### Schlussfolgerungen:

Eine hohe relative Fluoreszenzintensität korreliert mit einer hohen Anzahl an adhärenenten Zellen und so deuten die Ergebnisse der statistischen Auswertung darauf hin, dass die Adhäsion von T14V unter dynamischen Bedingungen erschwert war und dadurch geringer ausfiel als unter semistatischen Bedingungen. Weiterhin lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass sich der Einfluss des Materials auf die Adhäsion unter dynamischen Bedingungen weniger bemerkbar machte als unter semistatischen Bedingungen, Empress aber ebenfalls am geringsten von T14V kolonisiert wurde.

In Kapitel 5.1.5 wird detailliert diskutiert inwieweit die Einwirkung von Abscherkräften Einfluss auf die Adhäsion und Biofilmbildung nimmt.



# Kapitel 5

## Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methoden

Wichtige Aspekte der Versuchsgestaltung und -durchführung, die diskutiert werden sollen, sind

- die Durchführung *in vitro*
- die Auswahl und Bearbeitung der untersuchten Werkstoffe/Materialien
- die Verwendung der Keime *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V
- die experimentelle Pellikelbildung
- die Biofilmbildung unter semistatischen Bedingungen und
- die Methoden zur Quantifizierung der adhären, (vitalen) Mikroorganismen.

#### 5.1.1 Biofilmbildung *in vivo* vs. *in vitro*

Ein Versuchsaufbau *in vitro*, der wie in der vorliegenden Untersuchung die Simulation der Bildung von Biofilmen zum Ziel hat, unterscheidet sich von den natürlichen Bedingungen der Mundhöhle in mehrfacher Hinsicht. So wirken im Mund antibakterielle Substanzen und Mechanismen, die eine Ansiedelung von Mikroorganismen erschweren wie beispielsweise die Anwesenheit von agglutinierenden Substanzen und die von der Tätigkeit der Kau-, Lippen- und Zungenmuskulatur unterstützte Spülwirkung des Speichels [202]. Zudem ist die Residentflora der Mundhöhle regelmäßig geringen Konzentrationen von antimikrobiellen Wirkstoffen und Agenzien für die Plaquekontrolle als Bestandteil von Zahnpasten oder Mundspüllösungen ausgesetzt. Agenzien für die Plaquekontrolle entfernen bereits angeheftete Zellen oder verhindern die Anhaftung neuer Zellen an die Zahnoberfläche, antimikrobielle Wirkstoffe töten Bakterien ab

oder hemmen ihr Wachstum [151]. Fluoride und Substanzen wie Chlorhexidin und andere Tenside nehmen durch ihre oberflächenaktive Wirkung ebenfalls Einfluss auf die Zahnoberfläche. Neben den bereits aufgezeigten Faktoren sind es in der Mundhöhle vor allem abrasive Einflüsse bei der mechanischen Zahnreinigung, die modifizierend auf die Pellikelbildung und Reifung wirken können [94]. Die Vielzahl an Keimen, die in der Mundhöhle anzutreffen sind [202], kann bei einem Versuchsaufbau *in vitro* ebenso wie die Wechselwirkung der Bakterien nicht vollständig simuliert werden [5, 6].

Ein Nachteil von Studien *in vitro* besteht also darin, dass sie die Situation *in vivo* aufgrund ihrer Komplexität [29] nicht komplett wiedergeben können [91]. Desweiteren haben sich die Ergebnisse von Untersuchungen *in vivo* als aussagekräftiger hinsichtlich der Frage, welche Parameter die orale Biofilmbildung betreffen, erwiesen als Experimente *in vitro* [29]. Ein Grund dafür könnte sein, dass sich eine *in vivo* gebildete Pellikel deutlich von einer *in vitro* entstandenen unterscheidet [91] (Details siehe Kap. 5.1.4) und damit auch das Muster der Adhäsion von Mikroorganismen bei der Biofilmbildung im Mund anders ausfällt als bei einem Experiment *in vitro* [195].

Während manche Autoren aus den genannten Gründen empfehlen Untersuchungen zum Verständnis der Bioadhäsion *in vivo* durchzuführen [91, 92], gelten Verfahren *in vitro* andererseits als bewährte Methode gezielt einzelne Parameter hinsichtlich ihres Einflusses auf die Adhäsion von Bakterien zu untersuchen, da im Gegensatz zur komplexen Situation *in vivo*, die durch Schwankungen von Einflussfaktoren wie Speichelfluss, Ernährung und oraler Mikroflora zudem intra- sowie interindividuelle Variationen aufweist [91], Studien *in vitro* unter standardisierten, kontrollier- und reproduzierbaren Bedingungen durchgeführt werden können [158, 164]. So sind die biologischen Schwankungen oft mehrere Male größer als experimentelle Fehler [91].

Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde daher besonderer Wert darauf gelegt, dass stets die gleichen Rahmenbedingungen (Herstellung und Vorbereitung der Prüfkörper, Herstellung und optische Dichte der Bakteriensuspensionen, Herkunft und Einwirkzeit des Speichels) vorlagen. Auch die Parameter Rauigkeit und Inkubationszeit blieben abgesehen von den Experimenten, in denen sie auf ihre Bedeutung für die bakterielle Adhäsion untersucht wurden, von Versuchsreihe zu Versuchsreihe konstant. Die Ergebnisse einer Studie *in vitro* bezüglich des Einflusses der untersuchten Parameter auf die bakterielle Adhäsion sind wesentlich von der Festlegung der Rahmenbedingungen, wie beispielsweise der Anwesenheit von Abscherkräften, der Oberflächenkonditionierung durch einen adsorbierten Proteinfilm und der Auswahl der Keime bzw. Kombination mehrerer Keime abhängig [29]. Wie im Folgenden dargestellt, wurden die experimentellen Bedingungen so gewählt, dass sie **der natürlichen Situation möglichst nahe** kamen.

### 5.1.2 Auswahl und Verarbeitung der Materialien

Wie in Studien von Rosentritt *et al.* [195] und Hannig [94] wurden in der vorliegenden Arbeit die Werkstoffgruppen Keramik, Metall und Kunststoff verglichen, wobei die getesteten prothetischen Materialien nach dem Kriterium ausgewählt wurden, möglichst **repräsentative Vertreter** aus jeder der drei für die Herstellung von Zahnersatz verwendeten Gruppen zu untersuchen. Die Wahl fiel auf die Verblendkeramik Empress, die Nichtedelmetalllegierung Girobond, den Verblendkunststoff Sinfony und den Prothesenkunststoff Palapress.

Empress zählt zu den etablierten vollkeramischen Systemen auf dem Dentalmarkt [130] (siehe Kap. 2.3.2.2). Die Prüfkörper wurden aus der Schneidmasse gefertigt, wodurch sichergestellt war, dass eine Oberfläche untersucht wurde, wie sie auch in der Mundhöhle mit Speichel und darin enthaltenen Bakterien in Kontakt steht. Girobond findet als Universallegierung Verwendung bei der Herstellung verschiedenster Formen von Zahnersatz [9] (siehe Kap. 2.3.1.2). Sinfony besitzt ebenfalls ein breites Indikationsspektrum [2]. Die hier verwendete Schmelzmasse dieses Verblendkomposits ist den Einflüssen der Mundhöhle direkt ausgesetzt (siehe Kap. 2.3.3.2). Palapress erschien als universeller Prothesenwerkstoff ebenfalls geeignet für die Versuche zur Untersuchung der bakteriellen Adhäsion und Biofilmbildung (siehe Kap. 2.3.3.3).

Die Anfertigung der Prüfkörper erfolgte gemäß Herstellerangaben; die weitere Bearbeitung erfolgte wie bei Hannig beschrieben unter Anwendung von Nassschleifpapier bis zur Körnung 4000 (500 für Versuchsreihe ②) bzw. Ziegenhaarbürstchen und Polierpaste [94]. Wie in Studien von Rosentritt *et al.* und Hahnel *et al.* [85, 195] sollten die fein polierten Oberflächen eine Rauigkeit von maximal  $0,08\text{ }\mu\text{m}$  aufweisen, um die Oberflächenrauigkeit deutlich geringer zu halten als  $0,2\text{ }\mu\text{m}$ , da aufgrund von Untersuchungen an Titanoberflächen von Bollen *et al.* postuliert wurde, dass  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  als Schwellenwert betrachtet werden kann bei dessen Unterschreitung sich die Oberflächenrauigkeit nicht mehr auf die bakterielle Adhäsion auswirkt [21] (siehe auch Kap. 5.2.3). Ein Ausschluss des Einflusses der Rauigkeit auf das Versuchsergebnis sollte bei Versuchsreihe ① und Versuchsreihe ③ gewährleistet sein, um andere Faktoren (Inkubationszeit, Materialchemie/freie Oberflächenenergie) auf ihre Bedeutung für die bakterielle Adhäsion untersuchen zu können. Die Rauigkeit der in Versuchsreihe ② verwendeten, grob polierten Prüfkörper überschritt hingegen  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  deutlich, da in Versuchsreihe ② der Einfluss der Rauigkeit auf die bakterielle Adhäsion untersucht wurde.

Die Kontrolle der Oberflächenrauigkeit erfolgte, indem der Mittenrauwert  $R_a$  (arithmetischer Mittelwert der Beträge aller Profilwerte des Rauigkeitsprofils, vgl. Kap. 3.2.1.3) mittels Profilometrie im Tastschlittenprinzip erfasst wurde. Bei dieser Form der Profilometrie handelt es sich um das konventionelle Verfahren, bei dem eine feine Diamantspitze (bei dem für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Gerät besitzt diese einen Spitzenradius von  $2\text{ }\mu\text{m}$  [88]) über

die zu prüfende Oberfläche geführt wird und somit in direktem Kontakt zu dieser steht [67]. Als Nachteil dieser Methode wird neben dem hohen Zeitaufwand [221] aufgeführt, dass nur ein kleiner Ausschnitt einer Oberfläche vermessen wird und es durch den Kontakt mit der Nadelspitze zu einer Beschädigung der Oberfläche kommen kann [24]. Alternative Möglichkeiten, die Rauigkeit einer Oberfläche ohne die genannten Nachteile zu erfassen, bestehen in berührungsfreien Verfahren. Dazu zählen die Rastertunnelmikroskopie, bei der nur ein Pseudokontakt zwischen Oberfläche und Messinstrument besteht, Verfahren, die mit Ultraschall arbeiten, und optische Methoden wie Ellipsometrie, Interferometrie und Laserreflexion [24, 67, 246]. Im Vergleich stellt die konventionelle Profilometrie gegenüber diesen Verfahren jedoch eine relativ günstige und technisch wenig aufwendige Methode dar, die zudem über eine hohe vertikale Auflösung verfügt und eine geringe Störanfälligkeit gegenüber Einflüssen aus der Umgebung aufweist [221].

Unter den aufgeführten Verfahren kommen die konventionelle Taststiftmethode und die Laserreflexion am häufigsten zum Einsatz. Whitley *et al.* kamen aufgrund von Vermessung metallischer Oberflächen zu dem Ergebnis, dass beide Methoden gleichwertig sind und die Laserreflexion die Taststiftmethode ersetzen kann [247]. Von Whitehead *et al.* wurde hingegen gezeigt, dass bei Untersuchung von Keramik zwischen den Ergebnissen dieser beiden Messmethoden nur eine geringe Korrelation vorhanden ist. Die beste Übereinstimmung der optischen Rauigkeit (die bei der Laserreflexion erfasst wird) besteht mit der mittleren Rautiefe  $R_z$  [246]. Aus diesen Ergebnissen zogen Whitehead *et al.* den Schluß, dass die Laserreflexion nicht als alleinige Methode zur Erfassung der Oberflächenrauigkeit geeignet ist und dass es bei Anwendung der Taststiftmethode zur Charakterisierung einer Oberfläche sinnvoll ist, nicht nur den Mittenrauwert  $R_a$ , sondern auch weitere Oberflächenkenngrößen wie die mittlere Rautiefe  $R_z$ , die mittlere Höhe der größten Profilsitzen innerhalb einer Einzelmessstrecke  $R_{pm}$  oder die mittlere Rillenbreite  $R_{sm}$  [148] zu erfassen [246]. Letzteres empfehlen auch Bollen *et al.* in der Absicht durch Erfassung mehrerer Oberflächenkenngrößen ein genaueres Bild vom Profil einer Oberfläche zu erhalten [20], da sich insbesondere der Mittenrauwert  $R_a$  hierfür als ungeeignet erwiesen hat [246]. Andererseits muss erwähnt werden, dass der Mittenrauwert  $R_a$  zwar nicht das Profil einer Oberfläche, durchaus aber die Rauigkeit einer Oberfläche beschreiben kann und somit für die vorliegenden Untersuchungen als Oberflächenkenngröße gut geeignet war. Dementsprechend ist der Mittenrauwert  $R_a$  die am häufigsten gemessene Oberflächenkenngröße [246] und diente in zahlreichen Studien zur Beschreibung der Oberflächenrauigkeit [36, 84, 88, 179]. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse der Profilometrie wurde zudem erhöht, indem der Taststift bei der Durchführung der Messungen senkrecht zu den zu erwartenden Schleifspuren bewegt wurde.

Um eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch eine eventuelle Kontamination der Prüfkörperoberflächen während ihrer Herstellung und Bearbeitung zu verhindern, war vor der Verwendung der Prüfkörper eine Reinigung ihrer Oberflächen erforderlich, wobei sich das Vorgehen



dabei an Studien verschiedener Arbeitsgruppen orientierte, die ebenfalls 70%-igen Ethanol und destilliertes Wasser verwendeten [5, 6, 93, 146, 203]. Ein solches chemisches Reinigungsverfahren ist einem mechanischen vorzuziehen, um eine Alteration der Prüfkörperoberflächen zu verhindern [94]. Wie bei Hannig und Rosentritt *et al.* empfohlen, wurden die Prüfkörper nach ihrer Reinigung einer einwöchigen Lagerung in sterilem Wasser unterzogen, um das Adhäsionsgeschehen auf den Werkstoffoberflächen unabhängig von der kurzzeitigen initialen und damit klinisch nicht relevanten antibakteriellen Wirkung von Kompositen und Kunststoffen durch Restmonomere untersuchen zu können [94, 195].

### 5.1.3 Auswahl, Kultivierung und Inkubation der Keime

Bei der Biofilmbildung *in vivo* kommt es nur in der initialen Phase zu einer direkten und dementsprechend auch durch die Oberflächeneigenschaften (Rauigkeit, Materialchemie/freie Oberflächenenergie) der Substrate beeinflussten Wechselwirkung zwischen oralen (pellikelbedeckten) Oberflächen und Bakterien, während diese in den folgenden Phasen an initial gebundene Bakterien adhären [156]. Da es das Ziel der vorliegenden *in vitro* ausgeführten Arbeit war, nur die unmittelbare Wechselwirkung zwischen (pellikelbedeckten) Oberflächen und Bakterien und ihre Abhängigkeit von verschiedenen Oberflächeneigenschaften zu untersuchen, sollte die initiale Phase der bakteriellen Adhäsion möglichst real simuliert werden. Dazu erschien es sinnvoll mit Streptokokken **und** Aktinomyzeten zu arbeiten, die als **Erstbesiedler** den initialen Kontakt zu oralen Oberflächen herstellen [156]. Hannig zeigte in einer Untersuchung *in vivo* zwar, dass die adhärente Mikroflora innerhalb der ersten sechs Stunden auf allen von ihm untersuchten Substratoberflächen nahezu ausschließlich aus kokkenförmigen Bakterien bestand, während stäbchenförmige Mikroorganismen von ihm nur selten gefunden werden konnten [94] und auch Nyvad *et al.* fanden in vier Stunden alter Plaque überwiegend Kokken [169]; im Gegensatz dazu stellten Li *et al.* jedoch – ebenfalls in einer Studie *in vivo* – fest, dass in den frühen Phasen (den ersten beiden Stunden) der Biofilmbildung Aktinomyzeten dominieren und sich das Verhältnis im weiteren Verlauf zu Gunsten der Streptokokken verschiebt [143]. Auch bei Marsh/Martin wird beschrieben, dass innerhalb der ersten zwei Stunden der Plaquebildung beide Keime häufig an den mit Pellikel überzogenen Zahnschmelz adhären [151].

Die Entscheidung für *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V unter der Vielzahl an Arten und Bakterienstämmen ist darin begründet, dass mit diesen beiden Bakterienstämmen in zahlreichen Studien [114, 115, 154, 177] gearbeitet wurde, aus denen Einzelheiten bezüglich ihrer Kultivierung und ihrer Koaggregation bekannt sind. Darüberhinaus wurde insbesondere von *Streptococcus gordonii* und *Actinomyces naeslundii* gezeigt, dass es sich um Frühbesiedler handelt [53, 198].

Jakubovics zufolge können die untersuchten Keime sowohl unter anaeroben [115] als auch unter aeroben [114] Bedingungen angezüchtet werden. Für die vorliegenden Untersuchungen erfolgte das Wachstum der Kulturen aufgrund der leichteren Durchführbarkeit unter aeroben Bedingungen und in Analogie zu den erwähnten Studien [114, 115, 154, 177] bei 37 °C in Herz-Hirn-Bouillon als Nährmedium. Die untersuchten Keime sollten so lange kultiviert werden, dass die herangewachsene Zellzahl zur Herstellung von Bakteriensuspensionen einer optischen Dichte von 0,3 (bei einer Wellenlänge von 540 nm) ausreichend war, da im Rahmen der Zellzahlbestimmung ermittelt wurde, dass dieser Wert bei beiden Keimen in etwa einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml entspricht (vgl. Kap. 4.1.2), womit eine Größenordnung vorliegt in der sich sowohl die *Streptococcus*- als auch die *Actinomyces*-Konzentration in Speichel bewegt (ein Milliliter Speichel enthält  $10^8$ - $10^9$  Mikroorganismen, wobei die Mikroflora des Speichels die Zusammensetzung der oralen Mikroflora reflektiert [100]; zu dieser trägt die Gattung *Streptococcus* circa 20%, die Gattung *Actinomyces* 5 bis 10% bei [19, 58, 202]). Um Kulturen mit einer ausreichenden Zahl an Zellen zu erhalten, erschienen – im Gegensatz zu Sardin *et al.*, die es bevorzugten mit Bakterien zu arbeiten, die sich in der exponentiellen Phase befinden, da zu diesem Zeitpunkt die Zellhydrophobizität erhöht scheint und es dadurch zu einer gesteigerten bakteriellen Adhäsion kommt [203] – Inkubationszeiten als geeignet, nach denen sich die Kulturen in ihrer stationären Phase befinden [149]. Darüberhinaus ist zu beachten, dass Zellen, die sich in der exponentiellen Phase ihres Wachstums befinden, beim Transfer in ein nährstoffreiches Medium ihr Wachstum fortsetzen können [176], wodurch sich die Zellzahl der Bakteriensuspensionen während der Versuchsdurchführung ändern kann und dementsprechend nicht mehr mit normierten Bakteriensuspensionen gearbeitet wird. Im Rahmen der Vorversuche konnte ermittelt werden, dass die stationäre Phase bei *Streptococcus gordonii* DL1 nach 10 Stunden, bei *Actinomyces naeslundii* T14V nach 20 Stunden erreicht ist. Dieser Unterschied korreliert mit der differierenden Generationszeit (Zeit, in der sich die Zellzahl verdoppelt hat [219]) beider Keime, die bei Streptokokken deutlich kürzer ist als bei anderen Bakterien wie beispielsweise auch Aktinomyzeten [120].

Nach Inkubation für 10 bzw. 20 Stunden wurden die gewachsenen Zellen zentrifugiert und gewaschen. Das hierzu verwendete PBS wurde eingesetzt, da es elektrostatische Interaktionen verhindert, über die bei der Anwendung von Lösungsmitteln wie Hexadecanen berichtet wurde [203]. Um eine mangelnde Vergleichbarkeit der Ergebnisse aufgrund ungleicher Zellzahlen in den verwendeten Bakteriensuspensionen zu verhindern, erfolgte anschließend die Konzentrationseinstellung der Bakteriensuspensionen anhand der optischen Dichte, allerdings ohne die bei einigen Autoren beschriebene Ultraschallbehandlung der Bakteriensuspensionen, die einen homogenisierenden Effekt durch Auflösung von Ketten und kleinen Aggregaten ausüben soll [203, 205, 211]. Während eine Studie von Van der Mei *et al.* zeigte, dass eine Ultraschall-

behandlung für 35 Sekunden bei 30 Watt unter Eiskühlung keine Zelllyse verursacht [233], berichten andere Autoren, dass eine Zellschädigung durch Kavitationseffekte nicht auszuschließen ist [232, 253].

Neben der in der vorliegenden Arbeit angewendeten photometrischen Methode zur Konzentrationseinstellung der Bakteriensuspensionen, die auch von zahlreichen anderen Untersuchern eingesetzt wurde [34, 84, 203, 205, 211], besteht eine alternative Möglichkeit in der Anwendung eines Zell-Zählers [140]. Insbesondere der CASY<sup>®</sup>-Zellzahlzähler findet häufig Verwendung bei wissenschaftlichen Studien [39, 196]. Die CASY<sup>®</sup>-Technologie ermöglicht durch die automatisierte Messung eine schnelle und sehr präzise Erfassung der Zellzahl. Die Messung der optischen Dichte ist zwar weniger präzise, jedoch korreliert auch sie mit einer Sensitivität von 500 Zellen linear mit der Zellzahl [79]. Den Vorteil der CASY<sup>®</sup>-Technologie, nur lebende Zellen zu erfassen [192], besitzt die photometrische Methode zwar nicht, in der vorliegenden Arbeit wurde jedoch zum einen durch die Verwendung der Kulturen am Beginn der stationären Phase und zum anderen durch eine lichtmikroskopische Beurteilung der Bakteriensuspensionen sichergestellt, dass mit lebenden Zellen gearbeitet wurde. Darüberhinaus stellt die Messung der optischen Dichte eine kostengünstige Möglichkeit zur Zellzahlbestimmung dar, die nicht mit einer Schädigung der Zellen einhergeht, wie es bei der Anwendung eines CASY<sup>®</sup>-Zellzahlzählers der Fall sein kann [224].

Zwar war es das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit zu beurteilen, ob und wie sich unterschiedliche Prüfkörpereigenschaften auf die Adhäsion von *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V auswirken; da es sich dabei jedoch um koaggregierende Keime handelt, sollte auch eingeschätzt werden, inwieweit es beim Adhäsionsvorgang zu einer gegenseitigen Beeinflussung beider Keime kommt. Dass dies möglich ist, zeigen Untersuchungen von Jakubovics *et al.*, die feststellten, dass *Streptococcus gordonii* DL1 als zuerst inokulierter Keim auf einer speichelkonditionierten Oberfläche *in vitro* signifikant die Anhaftung von *Actinomyces naeslundii* T14V verbessert [114]. Um die gegenseitige Beeinflussung von *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V beim Adhäsionsvorgang einschätzen zu können, wurde ein Drittel der Prüfkörper sequentiell mit beiden Keimen inkubiert – zunächst für die halbe Inkubationszeit nur mit der normierten *Streptococcus gordonii* DL1-Suspension, anschließend zusätzlich mit der normierten *Actinomyces naeslundii* T14V-Suspension. Je ein weiteres Drittel wurde als „Referenz“ nur mit *Streptococcus gordonii* DL1 bzw. nur mit *Actinomyces naeslundii* T14V inkubiert. Die sequentielle Inokulation an und für sich und auch die gewählte Reihenfolge erschien sinnvoll, da die Mehrzahl der Studien darauf hindeutet, dass Streptokokken die erste Phase der Biofilmbildung *in vivo* dominieren und Aktinomyzeten erst etwas später detektiert werden können [94, 120, 168, 169]. Die statistische Auswertung der Daten nach Abschluss der Untersuchungen ergab hingegen, dass in der vorliegenden Arbeit Aktinomyzeten in den ersten

Stunden der Biofilmbildung in größerer Zahl adhärirten als Streptokokken (siehe Kap. 5.2.1). Unter diesem Gesichtspunkt wäre es für die Untersuchung der gegenseitigen Beeinflussung beider Keime während des Adhäsionsvorgangs eventuell sinnvoller gewesen *Actinomyces naeslundii* T14V zuerst zu inokulieren. Darüberhinaus ist prinzipiell zu bedenken, dass die Normierung und Suspension der Zellen in PBS keine oder nur eine geringe Stoffwechselaktivität zulässt und somit ein wichtiger Aspekt der gegenseitigen Beeinflussung der beiden Keime mit den gewählten Inkubationsbedingungen nicht berücksichtigt worden ist. Um während des Adhäsionsvorgangs auch die Beeinflussung auf Stoffwechselebene mit einbeziehen zu können, hätten die normierten Suspensionen mit Nährmedium versetzt werden müssen. Allerdings wäre durch die dann mögliche Zellteilung nicht mehr gewährleistet gewesen, dass die Adhäsion bei einer reproduzierbaren, stets gleichen Zahl an Zellen erfolgt. Dies hätte zur Folge gehabt, dass eine Beurteilung des reinen Einflusses der Prüfkörpereigenschaften auf die Adhäsion – was das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war – nicht möglich gewesen wäre. Da deshalb feststand, dass für die Durchführung der Hauptversuche mit PBS normierte Bakterienlösungen verwendet würden, wurde bereits im Rahmen der Vorversuche untersucht, inwieweit beide Keime beim Wachstum Einfluss aufeinander nehmen. Dazu wurden wie von Jakubovics *et al.* [114] beschrieben Kokulturen durch sanftes Schütteln der gemischten Einzelkulturen erzeugt und das gemeinsame Wachstum beider Keime bei verschiedenen Inkubationskonstellationen untersucht. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass die vorliegende Arbeit nur sehr grobe Aussagen über die Beeinflussung beider Keime zulässt, da zur Aufklärung dabei ablaufender Mechanismen, wie beispielsweise der Regulation der Genexpression, Quantifizierungsmethoden wie DNA/RNA Amplifikation, Immunoassays, Fluoreszenzmikroskopie und Gensonden-Hybridisierung [68, 114, 115, 132, 177] erforderlich sind, die jedoch nicht zur Verfügung standen und für deren Anwendung die vorliegenden Untersuchungen auch nicht konzipiert waren.

Da die unmittelbare Wechselwirkung zwischen Substrat und Bakterium – deren Untersuchung das Ziel der vorliegenden Arbeit war – nur initial, solange der Biofilm in Form eines Monolayers (eine einzelne Schicht von an die Oberfläche gebundenen Zellen) vorliegt [69, 122], stattfindet, mussten für die Inkubation der Prüfkörper mit den normierten Bakteriensuspensionen Inkubationszeiten gewählt werden, innerhalb derer es noch nicht zur Ausbildung eines Multilayers (mehrere übereinanderliegende Schichten von Zellen) kommt [36]; in einem Multilayer beruht die bakterielle Adhäsion anders als in einem Monolayer nicht auf der Interaktion der Zellen mit der Oberfläche, sondern auf interzellulären Wechselwirkungen [122]. Schon kurze Zeit (weniger als sechs Stunden [66]) nach der Bildung eines bakteriellen Monolayers [69] beginnt der Übergang zum Multilayer durch Ausbildung von Mikrokolonien [66]. So konnten O´Toole und Kolter bei Untersuchungen *in vitro* nachweisen, dass bereits nach 30 Minuten ein Monolayer mit verstreuten Bakterien entsteht, der sich innerhalb von drei bis vier Stunden verdichtet,

nach fünf Stunden die Bildung erster Mikrokolonien aufweist und sich nach 7,5 Stunden zu einem drei- bis fünflagigen (Multilayer-)Biofilm entwickelt [175]. Jung *et al.* und Al-Ahmad *et al.* kamen bei Untersuchungen *in vivo* zu vergleichbaren Ergebnissen [5, 120].

Neben der Ausbildung eines Multilayers ist nach längeren Inkubationszeiten damit zu rechnen, dass die Bakterien aufgrund der nährstofffreien Lösung, in der sie suspendiert wurden (PBS), aus der stationären Phase in die Absterbephase übergehen können und dadurch das Ergebnis der Untersuchungen verfälscht wird [142]. Vor diesem Hintergrund und auch aufgrund des zweiten Aspekts bei der Auswahl der Inkubationszeit – es sollte eine ausreichende bakterielle Adhäsion gewährleistet sein – erschienen Inkubationszeiten in einem Rahmen von bis zu vier Stunden sinnvoll. Zwar wird von Ørstavik *et al.* eine Inkubationszeit von einer Stunde für die Kolonisierung von Substratoberflächen mit Mikroorganismen als ausreichend angegeben [171], meist erfolgt die Inkubation jedoch für einen längeren Zeitraum. So wurde für die Untersuchung des Einflusses der Rauigkeit auf die bakterielle Adhäsion in Versuchsreihe (2) wie bei Studien von Bürgers *et al.* und Hahnel *et al.*, die sich ebenfalls mit dem Einfluss der Rauigkeit beschäftigten eine Inkubationszeit von 2,5 Stunden [35, 36, 88] gewählt; in Versuchsreihe (3), in der die Bedeutung des Materials und seiner freien Oberflächenenergie untersucht wurde, wurden die Prüfkörper 4 Stunden lang mit den Bakteriensuspensionen inkubiert, wie es auch in Studien von Hahnel *et al.*, Montanaro *et al.* und Rosentritt *et al.* [86, 160, 195] zur Untersuchung der bakteriellen Adhäsion an verschiedene zahnärztliche Materialien der Fall war. Dass es sinnvoll ist, die Inkubationszeit in Abhängigkeit vom untersuchten Parameter (z.B. Rauigkeit) zu wählen und sich 2,5 Stunden bzw. 4 Stunden insbesondere für die Untersuchung des Einflusses der Rauigkeit bzw. der Materialchemie eignen, konnten Morgan und Wilson zeigen. So war die Anzahl an adhärenenten Bakterien in ihren Untersuchungen nach zwei Stunden linear mit der Rauigkeit angestiegen, während die Rauigkeit nach vier Stunden keinen Effekt mehr auf die Bakterienadhäsion zeigte. Die Materialchemie wirkte sich hingegen auch nach vier Stunden auf die Bakterienadhäsion aus [161]. In Versuchsreihe (1) wurden die Prüfkörper sowohl für 2,5 als auch für 4 Stunden und zudem – abweichend von den übrigen Versuchsreihen, in denen die Bildung eines Multilayers ausbleiben sollte – für 24 Stunden mit den Bakteriensuspensionen inkubiert, da es ein Ziel dieser Versuchsreihe war, auch die über die initiale Phase hinausgehende Entwicklung des Biofilms zu analysieren.

Im Anschluss an die Inkubation wurde die Bakteriensuspension ohne Berührung der Prüfkörperoberfläche abpipettiert, um eine eventuelle Beschädigung des entstandenen Biofilms zu verhindern. Zur Entfernung von nicht adhärenenten, lose auf der Oberfläche liegenden Zellen erfolgte wie von Ørstavik *et al.* und Montanaro *et al.* beschrieben das zweimalige Waschen der Prüfkörper mit PBS [160, 171]. Zwar ist bei diesem Vorgehen prinzipiell eine Ablösung von Zellen aus dem entstandenen Biofilm nicht auszuschließen, jedoch wurde mit einer speziell für das

Spülverfahren konstruierten Vorrichtung gearbeitet, die es erlaubt, dass die Spülflüssigkeit stets in einem Winkel von  $45^\circ$  im Randbereich der Wells auftritt und dadurch geringe Abscherkräfte auf den Biofilm einwirken.

#### 5.1.4 Experimentelle Pellikelbildung

Aufgrund ihrer großen Bedeutung für die Kolonisierung oraler Oberflächen (siehe Kap. 2.2.2.3) und um die Versuchsbedingungen den natürlichen Verhältnissen der Mundhöhle möglichst anzunähern und so die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, wurde bei den vorliegenden Untersuchungen die **Bildung einer Pellikel** auf den Prüfkörpern für notwendig gehalten. Zudem wurde gezeigt, dass die Anwesenheit eines Speichelproteinfilms auch bei Untersuchungen *in vitro* die Adhäsion von Bakterien beeinflusst [28].

Prinzipiell war für die vorliegenden Untersuchungen auch eine Pellikelbildung *in vivo* in Erwägung zu ziehen. Möglich ist dies beispielsweise durch Aufkleben der Prüfkörper auf Miniplastschienen [94, 167] oder ihre adhäsive Befestigung an der Zahnoberfläche von Probanden [8]. Allerdings treten bei diesem Vorgehen die in Kapitel 5.1.1 angesprochenen Probleme mangelnder Standardisier- und Reproduzierbarkeit auf. So zeigte Hannig, dass zwischen bukkal und palatinal getragenen Prüfkörpern erhebliche Unterschiede in der Dicke und Zusammensetzung der gebildeten Pellikel bestehen. Vor allem aufgrund von einwirkenden Scherkräften durch die permanente Zungenbewegung weist die Pellikel auf palatinalen Zahnflächen eine geringere Dicke auf [94]. Da eine auf allen Prüfkörpern gleichartige Pellikel die Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Adhäsion der untersuchten Keime an die verschiedenen Materialien darstellt, hätten die lokalen Unterschiede bei der *in situ* gebildeten Pellikel zur Folge gehabt, dass alle Prüfkörper in der gleichen Region der Mundhöhle lokalisiert sein müssen. Eine sich daraus ergebende geringe Prüfkörperanzahl pro Versuchsteilnehmer hätte durch Einbeziehen mehrerer Prüfkörperträger oder mehrfache Trageperioden kompensiert werden müssen, um die für die Erhebung von statistischen Auswertungen erforderliche Prüfkörperzahl zu gewährleisten. Beides ist allerdings schon allein aufgrund inter- und intraindividuelle Schwankungen der Speichelbildung [91] mit einer reduzierten Aussagekraft der Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses der untersuchten Faktoren (Rauigkeit, Inkubationszeit etc.) auf die Adhäsion der Bakterien verbunden. Desweiteren ist bei intraoral getragenen Prüfkörpern zu erwarten, dass schon bei einer sehr kurzen Tragezeit von nur zwei Stunden verschiedene Mikroorganismen an die Prüfkörperoberflächen adhäreren [143]. Dadurch wäre zum einen das Ziel der vorliegenden Arbeit, ausschließlich die Adhäsion von *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V zu untersuchen, beeinträchtigt gewesen, zum anderen hätte die Quantifizierung der adhären Zellen einen falschen Wert ergeben.

Zur Vermeidung der angesprochenen Probleme erschien es sinnvoller, die Pellikelbildung *in vitro* durchzuführen. Um eine Pellikel zu erhalten, wie sie auch *in vivo* zusammengesetzt ist, sollte mit **humanem Speichel** bzw. mit dem für die ursprünglich geplante Durchführung der Untersuchungen unter dynamischen Bedingungen hergestellten künstlichen Speichel gearbeitet werden, da sich dieser als geeigneter Ersatz für natürlichen Speichel erwiesen hat [83]. Allerdings kam der künstliche Speichel nicht zum Einsatz (als ersichtlich wurde, dass eine Versuchsdurchführung unter dynamischen Bedingungen nicht möglich ist, war lediglich ein Versuch erfolgreich durchgeführt worden, bei dem keine Konditionierung der Prüfkörper mit künstlichem Speichel erfolgt war) und so wurde in der vorliegenden Arbeit für die Simulation der Bildung einer Pellikel nur humaner Speichel verwendet. Dieser stammte aus Gründen der Vergleichbarkeit von nur einer Person und wurde zudem stets zur gleichen Tageszeit gewonnen, um neben den inter- auch intraindividuelle Unterschiede der Speichelzusammensetzung [74], die im Tagesverlauf beobachtet werden können [99], weitgehend auszuschließen.

Da auf eine aufwendige Gewinnung keimfreien Speichels aus den Ausführungsgängen der Speicheldrüsen, wie sie bei einigen Autoren beschrieben ist [198,249], verzichtet wurde, eine Kontamination der Prüfkörper mit anderen Keimen als *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V aber ausgeschlossen sein sollte, bedurfte es eines Verfahrens zur Sterilisation des gewonnenen Speichels. Mögliche Verfahren sind neben dem Einsatz chemischer Agenzien mit sterilisierender Wirkung (Wasserstoffperoxid, Ethylenoxid, Chlorhexidin) physikalische Methoden wie Gamma- bzw. UV-Bestrahlung, Zentrifugation und Filtration, die bei den vorliegenden Untersuchungen zur Anwendung kam [197]. Ein geeignetes Verfahren für die vorliegende Arbeit zeichnet sich dadurch aus, dass es die Sterilität des Speichels sicher gewährleistet und die Zusammensetzung des natürlichen Speichels sowie die Konformation bzw. Aktivität seiner Proteinkomponenten möglichst wenig verändert. Die Zentrifugation wurde zwar in einigen Studien eingesetzt [37,140], erfüllt aber wie die Behandlung von Speichel mit Wasserstoffperoxid die genannten Anforderungen nicht [218,248]. Williams und Kraus empfehlen die Verwendung von UV-Licht oder Ethylenoxid, da sie Proteingehalt und -aktivität nur wenig reduzieren. Einschränkung ist jedoch zu erwähnen, dass eine sichere Sterilisation durch UV-Bestrahlung nur gelingt, wenn dünne Speichelschichten behandelt werden, die zuvor zur Entfernung von Zellaggregaten filtriert oder zentrifugiert wurden, wodurch ein aufwendiges Procedere entsteht. Auch die Behandlung mit Ethylenoxid führt nur unter bestimmten Bedingungen zu sterilem Speichel; so muss der Speichel bei 4 °C für 24 Stunden behandelt werden. Um in kürzerer Zeit sterilen Speichel zu erhalten müsste auf 37 °C temperierter Speichel Ethylenoxid exponiert sein, wobei die Enzymaktivität bei dieser Temperatur stark abnimmt [248]. Verfahren, die eine sichere Sterilisation gewährleisten sind die Gammabestrahlung, die Filtration und die Behandlung des Speichels mit Chlorhexidin [197,218,248], wobei letzteres als oberflächenaktive

Substanz mit inhibierender Wirkung auf die bakterielle Adhäsion in der vorliegenden Arbeit ungeeignet gewesen wäre [80]. Unter den verbleibenden Verfahren Gammabestrahlung und Filtration ist laut Ruhl *et al.* die Gammabestrahlung zu bevorzugen, da sie im Gegensatz zur Filtration nicht mit einem Proteinverlust behaftet ist. Der Proteinverlust bei der Sterilfiltration beruht auf der Undurchlässigkeit der Filtermembran für Proteinaggregate und kann bis zu 50% betragen, wobei insbesondere Muzine betroffen sind [197, 218, 248]. Mit einer Reduktion der Enzymaktivität sind jedoch beide Verfahren verbunden, wobei dies bei der Gammabestrahlung insbesondere für Amylase, bei der Filtration für Lysozym gilt [197]. Trotz der Nachteile hinsichtlich der Zusammensetzung des sterilen Speichels bei Filtration gilt diese Methode als Standardverfahren [197, 248], auf das unter anderem bei Studien von Rosentritt *et al.* [195], Bürgers *et al.* [34, 35], Lee *et al.* [139] und Kolenbrander [132] zurückgegriffen wurde.

Um die Bildung einer „reifen“ Pellikel zu gewährleisten, die die Prüfkörper vollständig bedeckte, musste für deren Inkubation mit dem sterilen Speichel ein geeigneter Zeitraum gewählt werden. Bei Gerath werden 30 Minuten [74], bei Carlén *et al.* [37] sowie Shahal *et al.* [211] werden 60 Minuten als Inkubationszeit angegeben. Verschiedene Studien *in vivo* bestätigen, dass die Pellikel nach einer [227] bzw. einer halben Stunde [216] ihre maximale Dicke erreicht hat. Allerdings ist bei anderen Autoren zu lesen, dass die maximale Pellikeldicke erst nach zwei Stunden vorliegt [84, 98, 141]. Zudem besteht die Ansicht, dass orale Oberflächen zwei Stunden nach Entfernung der Pellikel wieder von einer solchen bedeckt sind [216], was unter anderem von Sönju *et al.* [226] und Hannig [94] gezeigt werden konnte. Hannig stellte in einer weiteren Studie zwar fest, dass die Pellikeldicke auch über eine Zeit von zwei Stunden hinaus zunimmt, jedoch zeigte er auch, dass die Funktionalität der Pellikel bereits nach zwei Stunden besteht, was er durch die Untersuchung der protektiven Wirkung unterschiedlich alter Pellikel gegen einwirkende Säuren nachweisen konnte [96]. Auch Rykke und Sönju kamen zu dem Schluss, dass nach zwei Stunden bereits eine ausgereifte Pellikel vorliegt, indem sie die chemische Zusammensetzung von Pellikeln untersuchten, die sich innerhalb von zwei bzw. 24 Stunden formiert hatten [200]. Dass es innerhalb der initialen zwei Stunden zu Reifungsvorgängen kommt, konnten auch Pratt-Terpstra *et al.* zeigen, die die Adhäsion oraler Streptokokken an verschiedene Materialien nach Inkubation mit natürlichem Speichel für fünf Minuten bzw. zwei Stunden untersuchten [183]. Vor diesem Hintergrund wurden wie bei Rosentritt *et al.* [195], Busscher *et al.* [28], Bürgers *et al.* [34] und Hahnel *et al.* [84, 85] zwei Stunden als Inkubationszeit gewählt. Indem dieser Zeitraum sicherstellt, dass eine „reife“ Pellikel entstanden ist, gewährleistet er auch weitestgehend der Realität entsprechende Ausgangsbedingungen für die Adhäsion der untersuchten Keime; so enthält die Pellikel im ausgereiften Zustand Proteinkomponenten, die die bakterielle Adhäsion fördern [183], wodurch erklärt wird, dass die Adhäsion der Bakterien überwiegend erst an eine zwei Stunden alte Pellikel erfolgt [172, 254].



Trotz aller Bemühungen eine möglichst natürliche Pellikel zu bilden, ist schon allein aufgrund des durch die Filtration bedingten Verlustes an Speichelproteinen davon auszugehen, dass eine *in vitro* gebildete Pellikel anders aufgebaut ist als eine *in vivo* formierte. So stellten Yao *et al.* fest, dass die elektrophoretische Untersuchung und die Analyse des Aminosäureprofils Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* gebildeter Pellikel erkennen ließen; eine *in vivo* formierte Pellikel enthielt keine PRPs und dementsprechend lag ein geringerer Gehalt an Prolin vor [254]. Eine Studie von Carlén kam zu dem Ergebnis, dass wesentliche Unterschiede im Amylase-, Albumin- und IgA-Gehalt von *in vitro* und *in vivo* gebildeter Pellikel bestehen [37]. Zudem wurden in *in vitro* Pellikeln mehr intakte Proteine gefunden als in *in vivo* Pellikeln, was Yao *et al.* darauf zurückführen, dass die Pellikel unter natürlichen Bedingungen einer ausgedehnten enzymatischen Prozessierung unterliegt [254], die *in vitro* so nicht möglich ist, da an der Pellikelreifung beteiligte Enzyme wie Transglutaminase *in vitro* ihre Aktivität verlieren und aufgrund der Abgeschlossenheit eines *in vitro* Systems auch nicht ersetzt werden können [141, 254]. Von Ørstavik und Kraus wurde zwar gezeigt, dass die Enzyme Lysozym und Amylase sowohl in *in vivo* als auch in *in vitro* Pellikeln enzymatische Aktivität besitzen [170]; es ist jedoch denkbar, dass es bei den Reifungsvorgängen auch zu einer Modifizierung der Struktur bzw. Konformation dieser und anderer Pellikelenzyme kommt, was zu einer Veränderung ihrer biologischen Aktivität und damit verbunden zu einer veränderten bakteriellen Adhäsion führen kann [92].

### 5.1.5 Biofilmbildung unter semistatischen Bedingungen

Für die Durchführung der Untersuchungen standen prinzipiell verschiedene Versuchsaufbauten zur Auswahl. Von Katsikogianni und Missirlis sowie Mampel *et al.* wird diesbezüglich zwar lediglich in statische und dynamische Verfahren differenziert [124, 150], von vielen Autoren wird jedoch von der Ausführung ihrer Untersuchungen zur Adhäsion von Bakterien an Oberflächen unter semistatischen Bedingungen berichtet [85, 87, 146, 171, 203, 230].

Unter einem dynamischen Versuchsaufbau wird im Allgemeinen die Anwendung einer Fließkammerapparatur verstanden, bei der sich die Bakteriensuspension in ständigem Fluss befindet, wodurch die durch den Speichelfluss bedingten dynamischen Verhältnisse der Mundhöhle imitiert werden sollen [104, 106, 124, 150, 195, 212]. Die Bedeutung der Begriffe „statisch“ und „semistatisch“ überschneidet sich entsprechend der unterschiedlichen Einteilung der Verfahren durch verschiedene Autoren teilweise [124]. So bezeichnen Katsikogianni und Missirlis sowie Mampel *et al.* einen Versuchsaufbau als statisch, bei dem keine Fließbewegung der Zellsuspension vorliegt und verstehen dementsprechend auch Versuchsaufbauten wie von Balazs *et al.* als statisch [124], der Glasfläschchen, in denen Prüfkörper mit Bakteriensuspensionen inkubiert

waren, einer ständigen Rotationsbewegung unterzog [14], während andere Autoren derartige Verfahren als semistatisch bezeichnen. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sich die Zellsuspension zwar nicht ständig im Durchfluss befindet, jedoch ununterbrochen in Bewegung gehalten wird, was beispielsweise durch Einsatz magnetischer Rührhilfen oder Schüttelinkubatoren erreicht wird, wohingegen in einem statischen System (im Sinne der Autoren, die in statisch, semistatisch und dynamisch differenzieren) überhaupt keine Bewegung der Zellsuspension erfolgt [85, 87, 146, 171, 203, 230].

Während mit semistatischen Methoden die in der Mundhöhle wirkenden Abscherkräfte nur teilweise imitiert werden können [85], kann mit einer dynamischen Versuchsanordnung die bakterielle Adhäsion an Substratoberflächen unter sorgfältiger Kontrolle der hydrodynamischen Bedingungen und der Durchflussmenge untersucht werden. Sie ermöglicht desweiteren die vorliegenden Abscherkräfte, die Fließgeschwindigkeit der einwirkenden Flüssigkeit und Kenngrößen der Strömungslehre wie Reynolds- und Pecletzahl zu berechnen [22, 182].

Die Möglichkeit, mit einem dynamischen Versuchsaufbau *in vitro* Abscherkräfte imitieren zu können, ist bei der Auswahl des Versuchsaufbaus zu berücksichtigen, da sich Abscherkräfte wesentlich auf die mikrobielle Adhäsion auswirken. So können orale Biofilme nur auf einer Oberfläche verbleiben, wenn die Adhäsionskräfte stärker sind als die Abscherkräfte [156]. Verdeutlicht wird dies durch die Ergebnisse von Untersuchungen *in vitro*, in denen die bakterielle Adhäsion an Festkörperoberflächen unter dynamischen Bedingungen untersucht wurde: eine Erhöhung der Fließrate auf das 30-fache führt zu einer Reduktion der mikrobiellen Adhäsion um 70 bis 80% [42], da durch den Speichelfluss auftretende abscherende Kräfte in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser eine Größe von  $(0,1 - 1,0) \times 10^{-5} \text{ N/cm}^2$  erreichen können und damit deutlich höher sind als die bakteriellen Adhäsionskräfte  $((4 - 7) \times 10^{-9} \text{ N})$  [250]. Dabei steigen die abscherenden Kräfte ab einem Partikeldurchmesser von einem Mikrometer überproportional an. Da sehr viele Bakterien, wie auch die beiden untersuchten Keime, eine Zellgröße von unter einem Mikrometer aufweisen [145, 210], bedeutet dies, dass einzelne Bakterien (vor allem im Bereich von Oberflächenirregularitäten) angehaftet bleiben, wohingegen bakterielle Aggregate (die einen größeren Durchmesser besitzen) nicht haften bleiben können, was zur reduzierten mikrobiellen Adhäsion unter Einwirkung von Abscherkräften beiträgt [94]. Auch die vorliegende Arbeit bestätigt durch den Vergleich der Adhäsion von *Actinomyces naeslundii* T14V unter semistatischen und dynamischen Bedingungen die Bedeutung von Abscherkräften für die bakterielle Adhäsion. So adhärirten unter dynamischen Bedingungen signifikant weniger Aktinomyzeten als unter semistatischen Bedingungen (siehe Kap. 4.3.4.2).

Durch die Kontrolle und Imitation von Abscherkräften, kann unter Anwendung eines Fließkammersystems die klinische Situation besser simuliert werden als mit einem semistatischen Versuchsaufbau [195], weshalb es für die Untersuchung von Biofilmen, die auf pellikelbedeckten

Oberflächen *in vitro* entstanden sind, als besonders empfehlenswert gilt [132, 195]. So wurde die Adhäsion von *Streptococcus mutans* an Glas von Busscher *et al.* [28] bzw. an verschiedene Restaurationsmaterialien von Eick *et al.* [55] unter Einsatz einer Fließkammer-Apparatur untersucht. Auch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten aufgrund der genannten Vorteile unter dynamischen Bedingungen erfolgen. Allerdings zeigte sich, dass das für die Fließkammer erforderliche Volumen an normierter Bakteriensuspension zwar von *Actinomyces naeslundii* T14V, nicht aber von *Streptococcus gordonii* DL1 hergestellt werden konnte. Beim Abzentrifugieren der Versuchskulturen konnte nur ein sehr kleines Zellpellet von *Streptococcus gordonii* DL1 gewonnen werden; der Überstand war zudem stark getrübt, was darauf hindeutet, dass eine große Zahl an Zellen suspendiert geblieben war und sich nicht abgesetzt hatte. Eine lichtmikroskopische Beurteilung der Versuchskultur und des Überstandes widerlegte die Vermutung, die geringe Menge an sedimentierten Zellen könnte in einer mangelnden Vitalität der Bakterien begründet sein. Auch eine Überprüfung der in den Vorversuchen ermittelten Inkubationszeit von 10 Stunden durch Zentrifugieren von länger und kürzer gewachsenen Kulturen führte nicht zur erforderlichen Größe des Zellpellets.

Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit in einem semistatischen Versuchsaufbau durchgeführt. Dazu wurden Prüfkörper wie bei Montanaro *et al.* [160] beschrieben in Wellplatten eingebracht und diese in Analogie zu Hahnel *et al.*, Bürgers *et al.* und Ørstavik *et al.* [34, 85, 171] nach der Inokulation mit den Bakteriensuspensionen während der gesamten Inkubationszeit – eingeschlossen in einer feuchten Kammer, um ein Verdunsten der Bakteriensuspension bzw. Indikatorlösung zu verhindern – einer ständigen Bewegung im Thermoschüttelgerät ausgesetzt. Eine bei einigen Autoren [146, 203, 205, 230] beschriebene Methode, Prüfkörper in ein größeres Gefäß einzubringen und semistatische Bedingungen durch ständiges Umrühren der im Gefäß befindlichen Bakteriensuspension zu erzeugen, führt zwar möglicherweise zu stärkeren Abscherkräften, jedoch eignet sich der dabei vorliegende Versuchsaufbau zum einen nicht für die hier angewandte Methode der Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität, bei der die Prüfkörper einzeln in Wells fixiert sein müssen, zum anderen können damit weniger Prüfkörper untersucht werden als es in der gleichen Zeit mit dem in der vorliegenden Arbeit angewandten Verfahren möglich ist. Der Vorteil des „high-throughput-screening“ besteht aber nicht nur gegenüber anderen semistatischen Versuchsaufbauten, auch im Vergleich zur Anwendung einer Fließkammer-Apparatur zeichnet sich der vorliegende Versuchsaufbau durch die Möglichkeit aus, sehr viele Prüfkörper in sehr kurzer Zeit untersuchen zu können.

Der Vorteil des dynamischen Verfahrens, Abscherkräfte besser imitieren zu können, hat bei Untersuchungen, die zur Beurteilung verschiedener Restaurationsmaterialien hinsichtlich ihrer Neigung zur Adhäsion oraler Keime, der Entstehung von Sekundärkaries und des Aspektes einer möglichst langen Haltbarkeit, dienen, zudem weniger Bedeutung, wenn man bedenkt, dass

Sekundärkaries naturgemäß sehr häufig in der Zahnhalsregion beginnt, da hier meist der Restaurationsrand liegt, und gerade in dieser Region Abscherkräfte nur schwach wirksam werden, wodurch besonders in diesem Bereich der Zähne bzw. der Mundhöhle große Mengen an Keimen anzutreffen sind [250]. Darüberhinaus konnten Bürgers *et al.*, die die Biofilmbildung auf unterschiedlichen Titanoberflächen *in vivo* und *in vitro* untersuchten, zeigen, dass ihr semistatisches *in vitro*-Modell in Kombination mit einer Quantifizierungsmethode auf Basis fluoreszierender Färbung, wie es auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (siehe Kap. 5.1.6), zu Ergebnissen führte, die sehr gut mit den Ergebnissen der Untersuchung *in vivo* übereinstimmten, woraus sie schliessen, dass das semistatische *in vitro*-Modell ein realistisches und reproduzierbares Modell zur Untersuchung der Bakterienadhäsion darstellt [34].

### 5.1.6 Quantifizierung der adhärenenten Mikroorganismen

Um vergleichende Aussagen über das Adhäsionsverhalten der untersuchten Keime an die verschiedenen Oberflächen treffen zu können, war ein Verfahren zur Quantifizierung der adhärenenten Zellen erforderlich. Prinzipiell können derartige Verfahren in direkte und indirekte Methoden unterschieden werden [11, 40]. Zu den direkten Verfahren zählen unter anderem die Licht-, Rasterelektronen-, Transmissionselektronen-, Epifluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie, wobei diese Methoden auch eine Visualisierung der entstandenen Biofilme erlauben [11, 40, 90, 164]; die Quantifizierung auf indirektem Weg kann u.a. durch Auszählen von auf Agarplatten gewachsenen Kolonien, Szintillationszählung radioaktiv markierter Zellen, Trübungsmessung, mit Hilfe eines Zellzählers und mittels (fluoreszierender) Färbungen erfolgen [10, 11, 164].

Die Auswahl des Verfahrens ist abhängig von der vorliegenden Fragestellung und dem Material, das untersucht wird [164]. So wird die Lichtmikroskopie als schnelle, günstige und einfach durchzuführende Methode, die eine Beobachtung der Adhäsion und Biofilmbildung in Echtzeit ermöglicht, zwar häufig genutzt, bietet jedoch aufgrund der geringen Auflösung wenig Information über die Struktur eines Biofilms, lässt zudem nur semiquantitative Aussagen zu, wenn die Auszählung in einem akzeptablen zeitlichen Rahmen erfolgen soll, und ist nur bei transluzenten Proben anwendbar, wodurch ihre Anwendung in der vorliegenden Arbeit ausschied [10, 40, 90, 159]. Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie ist mit dem Rasterelektronenmikroskop zwar keine Betrachtung der Zellen in ihrem nativen Zustand möglich und seine Anwendung ist mit einem höheren apparativen und zeitlichen Aufwand verbunden, da die Proben zunächst vorbereitet werden müssen (wobei sämtliche Zellen abgetötet werden) und nur verhältnismäßig kleine Ausschnitte beurteilt werden können, jedoch können sowohl transluzente als auch opake Proben untersucht werden [40, 159]. Darüberhinaus bietet es eine detaillierte dreidimensionale Einsicht bei sehr unterschiedlichen Auflösungen, die deutlich höher sind als bei einer lichtmi-

kroskopischen Untersuchung [40,63,90]. Eine noch höhere Auflösung (unter 0,1 nm) ist mit der Transmissionselektronenmikroskopie möglich, die als Goldstandard in der Elektronenmikroskopie gilt und sehr gut für die Strukturanalyse eines Biofilms geeignet ist [40,90,159]. Allerdings bleibt ihre Anwendung auf die Untersuchung weicher Substrate beschränkt, da für die Analyse eine Anfertigung ultradünner Schnitte erforderlich ist [40]. Insbesondere für die Untersuchung von Biofilmen auf Kunststoffen ist die Transmissionselektronenmikroskopie ungeeignet, da diese aufgrund eines hohen Füllstoffgehalts von bis zu 80% eine schlechte Schneidbarkeit aufweisen, was in Artefakten oder der Kompression der Materialstruktur münden kann [81]. Zwar muss auch bei der Probenvorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie damit gerechnet werden, dass es zur Ablösung von Zellen kommen kann [164], jedoch lässt sich die Entstehung von Artefakten bzw. eine Zerstörung der entstandenen Biofilmstruktur durch ein schonendes Vorgehen verhindern [90], was durch die angefertigten Aufnahmen bestätigt wird. Ein weiteres Verfahren mit dem eine durch die Probenvorbereitung bedingte Veränderung des Biofilms verhindert werden kann, ist die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (engl.: confocal scanning laser microscopy, CSLM), die eine besondere Form der Epifluoreszenzmikroskopie darstellt. Bei dieser Technik werden Biofilme ohne Fixierung oder Einbettung untersucht, indem in verschiedenen Tiefen optische Dünnschnitte angefertigt und computergestützt zu einem dreidimensionalen Bild zusammengefügt werden [151]. Die Laser-Raster-Mikroskopie wird insbesondere aufgrund der Möglichkeit, spezifische Strukturen in einem Biofilm sichtbar machen zu können, ebenso wie die Transmissionselektronenmikroskopie vor allem für die räumliche Strukturanalyse von Biofilmen eingesetzt [4,40,132]. Da es die vorrangige Absicht der vorliegenden Arbeit war, die Adhäsion der untersuchten Keime an verschiedene Oberflächen zu beurteilen und zu vergleichen, wären diese beiden Methoden weniger geeignet gewesen als die vergleichsweise günstige und leicht verfügbare Rasterelektronenmikroskopie [40,90], die eine etablierte Methode darstellt die Morphologie einer Materialoberfläche und der an ihr adhären Bakterien zu visualisieren [10,90], wozu sie im vorliegenden Fall in erster Linie eingesetzt wurde.

Prinzipiell wäre auch eine quantitative Analyse mittels Rasterelektronenmikroskopie möglich gewesen, diese Anwendung ist jedoch zeitintensiv und weist eine geringe Reliabilität auf [10,40,90]. Die mangelnde Tauglichkeit der Rasterelektronenmikroskopie für die Quantifizierung ist jedoch kein spezifischer Nachteil dieser Methode; alle elektronenmikroskopischen Techniken und auch die CSLM, bei der es beim Auszählen zu Abweichungen von der tatsächlichen Zellzahl kommen kann, da zum einen schwache Fluoreszenzsignale zur Erhöhung der Bildschärfe ausgeblendet werden, zum anderen nicht zwischen einem Signal, das durch ein einzelnes Bakterium und einem Signal, das durch ein Bakterienaggregat hervorgerufen ist, differenziert werden kann [4,10], eignen sich wenig für quantitative Aussagen [90,159,164]. Um die Biofilme nicht nur zu visualisieren und semiquantitative Aussagen treffen zu können, was mit der

Rasterelektronenmikroskopie sehr gut möglich ist, wurde zur Quantifizierung der adhärenen Zellen eine fluoreszierende Färbung eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein indirektes Verfahren, bei dem die adhärenen Zellen *in situ* gezählt werden. Bei anderen indirekten Verfahren wie dem Auszählen von auf Agarplatten gewachsenen Kolonien (CFUs), der Szintillationszählung radioaktiv markierter Zellen, der Trübungsmessung oder der Anwendung eines Zellzählers müssen die Zellen zunächst vom Substrat gelöst werden [40]. Abgesehen davon, dass ein derartiges Verfahren eine rasterelektronenmikroskopische Beurteilung der entstandenen Biofilme unmöglich gemacht hätte, kann es bei der Ablösung der Zellen, die mittels oberflächenaktiver Substanzen, Homogenisierung oder Ultraschall erfolgt [10], zum einen zu ihrer Beschädigung kommen, zum anderen bleibt unklar, wie viele Zellen adhäreniert bleiben [40, 159, 164]. Zudem eignen sich indirekte Verfahren, die mit einer Ablösung der Zellen vom Substrat verbunden sind, wenig für die Analyse vieler kleiner Proben, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden [164]. Darüberhinaus bestehen weitere spezifische Nachteile der genannten Methoden. So ist die Zellzahlbestimmung durch Szintillationszählung radioaktiv markierter Zellen zwar ein sehr sensitives „high-throughput“ Verfahren; die Anwendung ist jedoch speziellen Laboratorien vorbehalten, da sie den Einsatz eines besonderen Instrumentariums und kritischer Substanzen erfordert, wodurch zudem hohe Kosten entstehen [10, 40]. An der Trübungsmessung kann kritisiert werden, dass durch die Erfassung der optischen Dichte nicht zwischen lebenden und toten Zellen differenziert werden kann [10]. Dieses Problem besteht bei der Bestimmung der CFUs, die als Standardmethode für die Zellzahlbestimmung bei *in vitro* Untersuchungen gilt, zwar nicht, jedoch ist diese Methode sehr arbeits- und zeitintensiv und kann aufgrund mangelnder Kultivierbarkeit mancher Keime zur Selektion bestimmter Arten und damit zu einem verfälschten Ergebnis führen [10, 90]. Als Alternative zur Koloniezahlbestimmung wurden verschiedene Analyseverfahren (Assays) entwickelt, die in Assays zur Quantifizierung der Matrix bzw. der Biofilm-Biomasse (Matrix, lebende und tote Zellen) und in Vitalitätsassays, mit denen sich die lebensfähigen Zellen quantifizieren lassen, eingeteilt werden können [178]. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Vitalitätstest CytoX-Violet™ erfasst die Zellvitalität, indem durch die Aktivität der zellulären Dehydrogenase eine Veränderung der Fluoreszenzintensität der Indikatorlösung erfolgt, die direkt proportional zur Vitalität ist [60].

Zwar ergab die Literaturrecherche, vermutlich aufgrund der kurz zurückliegenden Einführung des CytoX-Violet™ Testsets, nur wenig Referenz zur Verwendung dieses Vitalitätstest [33]; sein Einsatz versprach jedoch Vorteile gegenüber den zur Auswahl stehenden Alternativen. So wäre der Einsatz des Tetrazoliumsalzes XTT und insbesondere auch die Verwendung der verwandeten „Vorgänger“-Substanz MTT mit einem um mehrere Stunden höheren Zeitaufwand verbunden gewesen [178, 193]. Vergleichende Studien über die Verwendung von XTT und CytoX-Violet™ liegen zwar nicht vor, jedoch ist bekannt, dass XTT eine geringere Sensitivität aufweist als

beispielsweise die „Alamar Blue“-Fluoreszenzfärbung [178]. Im Vergleich zu dieser Methode, die auf der Reduktion der blauen, nicht-fluoreszierenden Indikatorsubstanz Resazurin zum violetten, fluoreszierenden Resorufin durch die metabolische Aktivität lebender Zellen beruht und aufgrund ihrer Sensitivität und einfachen sowie schnellen Anwendung eine etablierte Methode zur Erfassung der Zellvitalität darstellt, ist die Verwendung von CytoX-Violet™ zwar ebenfalls zeitaufwendig, was in der 2,5-stündigen Inkubation mit der Indikatorlösung begründet ist, die im Anschluss an die Inkubation mit der Bakteriensuspension erfolgt; jedoch wird für die Inkubation mit Resazurin, die nur dann einen Zeitvorteil bietet, wenn die Inkubation gemeinsam mit der Bakterieninkubation erfolgt [195], empfohlen, eine Dauer von maximal einer Stunde nicht zu überschreiten, da es bei prolongierten Inkubationszeiten zur Reduktion des fluoreszierenden Resorufins zum farblosen Hydroresorufin kommen kann [174, 178]. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Inkubationszeiten von 2,5 bis 24 Stunden wäre somit eine durch diese unerwünschte Reaktion bedingte Verfälschung der Messergebnisse nicht auszuschließen gewesen. Darüberhinaus unterscheidet sich der Versuchsablauf bei Anwendung des „Alamar Blue Assays“ vom Versuchsablauf der vorliegenden Arbeit insofern, als dass aufgrund der teilweise starken Eigenfluoreszenz zahnärztlicher Materialien [90] ein zusätzlicher Arbeitsschritt zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz der Prüfkörper erforderlich ist, um später die entsprechenden Werte vom Ergebnis der Fluoreszenzmessung nach abgeschlossener Inkubation abziehen zu können [195]. Dieser Arbeitsschritt war bei Verwendung von CytoX-Violet™ nicht erforderlich, da die Fluoreszenzmessung nicht anhand der mit den Prüfkörpern bestückten Wellplatten erfolgte, sondern der Überstand aus diesen nach abgeschlossener Inkubation mit CytoX-Violet™ zur Messung in eine neue Wellplatte überführt wurde.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

Es soll diskutiert werden, inwiefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (grau hinterlegt) im Einklang bzw. Widerspruch zu anderen Studien stehen, die sich ebenfalls mit der Bedeutung

- der Bakterienart
- der Inkubationszeit
- der Anwesenheit einer Speichelpellikel
- der Oberflächenrauigkeit und
- der Materialchemie/Oberflächenenergie

für die Kolonisierung zahnärztlicher Materialien beschäftigten.

### 5.2.1 Keim und Inkubationszeit

Die untersuchten Keime adhärten unabhängig von der An- oder Abwesenheit einer Speichelpellikel und unabhängig von Rauigkeit und Material der Prüfkörper, jedoch in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in unterschiedlicher Anzahl: Bei 2,5- bzw. 4-stündiger Inkubationsdauer zeigte *Streptococcus gordonii* DL1 stets die geringste, *Actinomyces naeslundii* T14V die ausgeprägteste Adhäsion ( $DL1 < \text{beide} < T14V$ ); bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden wies *Actinomyces naeslundii* T14V hingegen die geringste Adhäsion auf, während die Ko-Inkubation mit beiden Keimen zur stärksten Kolonisierung der Prüfkörper führte ( $T14V < DL1 < \text{beide}$ ).

Prinzipiell steht die Feststellung, dass Streptokokken und Aktinomyzeten in unterschiedlichem Ausmaß adhärten, im Einklang mit anderen Untersuchungen; allerdings kamen diese im Hinblick auf die Frage, wie ausgeprägt die Adhäsion der beiden Gattungen zu frühen Zeitpunkten erfolgt, teilweise zu Ergebnissen, die von denen der vorliegenden Arbeit abweichen. So zeigten Nyvad und Kilian bei Studien *in vivo*, dass in einem vier Stunden alten Biofilm Streptokokken überwiegen [168, 169]. Die ausgeprägte Adhäsion von Aktinomyzeten nach kurzer Zeit, wie sie in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, konnte dementsprechend in diesen, aber auch anderen Studien nicht festgestellt werden [5, 6]. Insbesondere aufgrund der Ergebnisse von Nyvad und Kilian, die feststellten, dass Streptokokken bis zu 78% der initial adhärrierenden Keime betrug, wurde postuliert, Streptokokken würden die frühen Phasen der Biofilmbildung dominieren [6, 49]. Von Dige *et al.* sowie Al-Ahmad *et al.* wird diesbezüglich allerdings darauf hingewiesen, dass Nyvad und Kilian Untersuchungsmethoden einsetzten, die auf der Kultivierung von Mikroorganismen beruhen, wobei es aufgrund der Nicht-Kultivierbarkeit einiger Keime und der daraus resultierenden Selektion zu einer Überschätzung der Streptokokken- und Unterbewertung der Aktinomyzetenanzahl gekommen sein könnte [5, 6, 49]. Hannig *et al.*, die moderne Quantifizierungsmethoden wie Fluoreszenzfärbungen anwandten, fanden deutlich weniger Streptokokken (circa 25%) in den ersten Stunden der Biofilmbildung [93].

Trotz dieser zur Erfassung der adhärenen Mikroorganismen besser geeigneten Methoden war bei Hannig *et al.* wie auch bei den Studien von Nyvad und Kilian eine Untersuchung, welche Streptokokken-Arten an den Oberflächen gebunden hatten, nicht möglich. Dass eine derartige Differenzierung jedoch von Bedeutung ist, wird durch eine Untersuchung *in vivo* von Li *et al.* verdeutlicht, die durch die Anwendung einer DNA-DNA-Hybridisierung feststellten, dass das Adhäsionsverhalten verschiedener Arten innerhalb einer Gattung stark variieren kann. So konnte der Keim *Streptococcus gordonii* in einem sechs Stunden alten Biofilm in deutlich geringeren Mengen gefunden werden als *Streptococcus oralis* und *Streptococcus mitis*; *Actinomyces naeslundii* *genospecies* 1 war weniger vertreten als *Actinomyces naeslundii* *genospecies* 2. Weiterhin konnte von Li *et al.* gezeigt werden, dass insbesondere *Actinomyces naeslundii* *genospecies* 2, zu



denen auch der hier untersuchte Keim *Actinomyces naeslundii* T14V zählt, in einem zwei bzw. vier Stunden alten Biofilm häufiger vertreten war als *Streptococcus gordonii*, was im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht [143]. Übereinstimmend mit Li *et al.* stellten Van der Mei *et al.* bei einer Untersuchung *in vitro* fest, dass verschiedenen Streptokokken-Arten (*Streptococcus oralis*, *mitis*, *sanguinis*) nach 2-stündiger Inkubation unterschiedlich häufig adhären und eine im Vergleich zur Zahl an adhärenen *Actinomyces naeslundii* T14V-Zellen geringere Adhäsion aufwiesen [233]. Andererseits fanden Foster und Kolenbrander bei einer Studie *in vitro* ein im Vergleich zum *Streptococcus gordonii* DL1-Biovolumen kleineres *Actinomyces naeslundii* T14V-Biovolumen nach einer Stunde. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Arbeit nicht das Biovolumen bestimmt wurde und die genannte Studie somit eine begrenzte Vergleichbarkeit für die Diskussion der vorliegenden Ergebnisse aufweist [51]. In diesem Zusammenhang lässt sich festhalten, dass die Anwendung unterschiedlicher Quantifizierungsmethoden und die damit häufig verbundene fehlende Differenzierung in verschiedene Streptokokken- und Aktinomyzeten-Arten für die teilweise vorhandene Abweichung der vorliegenden Ergebnisse von anderen Studien verantwortlich sein könnten.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach Inkubationszeiten von 2,5 und 4 Stunden, stehen die Ergebnisse nach 24-stündiger Inkubation in guter Übereinstimmung mit anderen Studien. So stellten auch Al-Ahmad *et al.* und Dige *et al.* bei ihren Untersuchungen *in vivo* fest, dass Streptokokken nach 12 bzw. 24 Stunden einen größeren Anteil der Biofilm-Mikroorganismen darstellten als Aktinomyzeten [5, 6, 49]. Wie Dige *et al.* zeigen konnten, vermehrten sich beide Gattungen, wobei es jedoch aufgrund der im Vergleich zu Streptokokken langsameren Zellteilung der Aktinomyzeten letztendlich zu einem Überwiegen der Streptokokken kam [49]. Insbesondere für den Vergleich von *Actinomyces naeslundii* T14V und *Streptococcus gordonii* DL1 wurden diese differierenden Wachstumsraten nachgewiesen [68] und auch die vorliegende Arbeit kann die geringere Wachstumsrate von *Actinomyces naeslundii* T14V bestätigen (siehe Kap. 4.1.1). Anders als bei den erwähnten Studien [5, 6, 49], die ein Wachstum der Keime zuließen, ist die fast doppelt so lange Generationszeit von Aktinomyzeten [5, 93, 120] als Begründung für die im Vergleich zu *Streptococcus gordonii* DL1 geringere Adhäsion von *Actinomyces naeslundii* T14V, wie sie in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, jedoch nicht anwendbar, da die Suspension der Zellen in einer nährstofffreien Lösung (PBS) erfolgte, die eine Zellteilung verhindert. Abgesehen davon beruhte das Ergebnis T14V < DL1 nach 24 Stunden nicht etwa darauf, dass die Zahl an adhärenen Aktinomyzeten bei zunehmender Zahl an adhärenen Streptokokken konstant geblieben wäre bzw. ebenfalls langsam zugenommen hätte, wie es von Foster und Kolenbrander sowie Dige *et al.* gezeigt wurde [49, 68]; vielmehr kam es zu einer Abnahme der Adhäsion von *Actinomyces naeslundii* T14V bei gleichzeitiger Zunahme der Adhäsion von *Streptococcus gordonii* DL1, wie die Ergebnisse aus der Untersuchung des Einflusses der

Inkubationszeit auf die bakterielle Adhäsion zeigen: während die Inkubation mit *Streptococcus gordonii* DL1 und die Ko-Inkubation mit beiden Keimen nach 24 Stunden zu einer stärkeren Kolonisierung der Prüfkörper führte als nach 2,5 und 4 Stunden ( $2,5 = 4 < 24$ ), nahm die Adhäsion von *Actinomyces naeslundii* T14V mit zunehmender Inkubationsdauer kontinuierlich ab ( $24 < 4 < 2,5$ ). Auch Li *et al.*, Palmer *et al.* sowie Foster und Kolenbrander kamen zu einem solchen Ergebnis [68, 143, 176].

Eine mögliche Ursachen für die reduzierte Menge an adhärenenten Aktinomyzeten könnte zum einen eine aufgrund zu geringer Adhäsionskräfte mit zunehmender Inkubationszeit stattfindende Ablösung von vitalen, zunächst adhärenenten Zellen sein. Zum anderen ist auch denkbar, dass adhärenente Zellen ihre Vitalität verloren hatten und deshalb entweder ebenfalls ihre Ablösung stattfand oder ihre Adhäsion zwar weiterhin bestand, sie aufgrund des Quantifizierungsprinzips (Vitalitätsassay) aber nicht mehr erfasst wurden. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sind zwar zur Beurteilung der Vitalität adhärenenter Zellen weniger geeignet als es beispielsweise eine Lebend-Tot-Färbung wäre, weshalb die folgende Aussage in gewissem Maße spekulativ bleibt, jedoch waren, soweit eine Beurteilung anhand morphologischer Kriterien der adhärenenten Zellen und Biofilme erfolgen kann, keine Unterschiede hinsichtlich der Gestalt der Zellen nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten zu erkennen; die Kontinuität der *Actinomyces naeslundii* T14V-Biofilmstruktur erschien nach 24 Stunden etwas unterbrochen und weniger dicht als nach 2,5 oder 4 Stunden, während der *Streptococcus gordonii* DL1-Biofilm nach 24 Stunden eine dichtere Struktur aufwies als nach 2,5 oder 4 Stunden. Dies spricht zum einen dafür, dass keine devitalen Zellen adhäriert geblieben waren, zum anderen dafür, dass es im Verlauf der 24-stündigen Inkubation zu einer Ablösung zunächst adhärenenter Aktinomyzeten gekommen war, wobei offen bleibt, ob dies allein aufgrund schwacher Adhäsionskräfte oder in Kombination mit einem Vitalitätsverlust erfolgte. Letzteres ist durchaus möglich, waren die Zellen doch 24 Stunden in einer nährstofffreien Lösung (PBS) suspendiert. Allerdings ist es naheliegend zu vermuten, dass auch die Zahl an adhärenenten vitalen Streptokokken unter diesen Bedingungen hätte abnehmen müssen, was jedoch nicht der Fall war. Interessanterweise konnten Palmer *et al.* in einer Studie *in vitro*, die sich mit der Biofilmbildung von *Actinomyces naeslundii* T14V und *Streptococcus gordonii* DL1 unter Einsatz von Speichel als Nährlösung befasste, jedoch zeigen, dass *Streptococcus gordonii* DL1 im Gegensatz zu *Actinomyces naeslundii* T14V in der Lage war, Speichel als Nahrungsquelle zu nutzen und die Zahl an adhärenenten, vitalen Aktinomyzeten in Folge dessen über einen Zeitraum von 18 Stunden hinweg abnahm, während die Zahl an adhärenenten, vitalen Streptokokken stetig zunahm [176]. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein und spricht für einen Vitalitätsverlust von *Actinomyces naeslundii* T14V als vorrangige Ursache für seine über 24 Stunden hinweg reduzierte Adhäsion.

Im Gegensatz zu Palmer *et al.*, die schon nach vier Stunden eine Abnahme der Vitalität von *Actinomyces naeslundii* T14V feststellen konnten, zeigten Foster und Kolenbrander, die ähnlich wie Palmer *et al.* die Adhäsion von *Actinomyces naeslundii* T14V und *Streptococcus gordonii* DL1 nach ein und 14 Stunden untersuchten, dabei ebenfalls Speichel als Nährmedium zur Verfügung stellten und ebenfalls lediglich im Fall von *Streptococcus gordonii* DL1 eine Biofilmbildung feststellten, dass nach 14 Stunden mehr als 90% der Streptokokken und Aktinomyzeten keinen Zellschaden aufwiesen [68]. Neben diesen differierenden Ergebnissen bezüglich der Vitalität von *Actinomyces naeslundii* T14V unter Anwendung von Speichel als Nährmedium ist zu berücksichtigen, dass in der vorliegenden Arbeit PBS und nicht Speichel eingesetzt wurde, letzterer (zwar kein ideales Nährmedium) im Gegensatz zu PBS aber immerhin eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle darstellt [176]. Somit sind weder die Ergebnisse von Foster und Kolenbrander (Streptokokken und Aktinomyzeten bleiben vital) noch von Palmer *et al.* (nur Streptokokken bleiben vital) auf die vorliegende Arbeit übertragbar. In Anbetracht der nicht vorhandenen Eignung von PBS als Wachstumsmedium und der dennoch über 24 Stunden hinweg nicht abnehmenden Zahl an vitalen Streptokokken ist es jedoch wahrscheinlicher, dass auch bei den Aktinomyzeten kein Vitalitätsverlust eingetreten war.

Weiterhin sprechen einige Studien, die sich mit der Untersuchung bakterieller Adhäsionskräfte beschäftigten, für die These, dass es allein aufgrund mangelnder Adhäsionskraft zu einer Ablösung adhärenter Aktinomyzeten-Zellen gekommen ist. So konnten Mei *et al.* zeigen, dass die initiale Adhäsionskraft bei längerer Kontaktzeit von Zelle und Substrat durch vermehrt auftretende Wasserstoffbrückenbindungen zunimmt, indem diese das Auftreten spezifischer Rezeptor-Liganden-Bindungen ermöglichen [156, 157]. Dieser Vorgang nimmt bei den stäbchenförmigen Aktinomyzeten mehr Zeit in Anspruch als bei den kugelförmigen Streptokokken, die aufgrund ihrer Gestalt schneller in die entropisch günstigste und mit der höchsten Adhäsionskraft verbundene Positionierung zur Oberfläche finden [233]. Allerdings findet dieser Vorgang bereits innerhalb von zwei Minuten statt [156] und ist somit für die Erklärung der im Vergleich zu *Streptococcus gordonii* DL1 geringeren Adhäsion von *Actinomyces naeslundii* T14V, wie sie in der vorliegenden Arbeit nach 24-stündiger Inkubationsdauer beobachtet wurde, weniger relevant als die Feststellung, dass es im Hinblick auf die Höhe der durch das „bond-strengthening“ erreichten Adhäsionskraft Unterschiede zwischen Aktinomyzeten und Streptokokken gibt [155, 233]. So konnten Mei *et al.* zeigen, dass *Actinomyces naeslundii* T14V auf einer Polymer- bzw. Metalloberfläche eine geringere Adhäsionskraft aufweist als verschiedene Streptokokken-Stämme, darunter *Streptococcus mitis* ATCC9811, *Streptococcus sanguinis* ATCC10556 und *Streptococcus oralis* J22 [155]. Allerdings gilt dies den Ergebnissen von Mei *et al.* zufolge nur, solange die Oberflächen nicht von einer Speichelpellikel bedeckt sind. Sobald eine Speichelpellikel vorhanden ist, besitzt nur noch *Streptococcus mitis* ATCC9811 eine stärkere Adhäsionskraft als

*Actinomyces naeslundii* T14V, während die übrigen Streptokokken schwächere Adhäsionskräfte aufweisen [155]. Dass *Actinomyces naeslundii* T14V in der vorliegenden Arbeit sowohl in An- als auch in Abwesenheit einer Speichelpellikel eine geringere Adhäsion als *Streptococcus gordonii* DL1 aufwies, kann – auch wenn es für diese Vermutung noch keine Bestätigung gibt, da bisher in keiner Studie ein Vergleich der Adhäsionskraft von *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V erfolgte – als Hinweis darauf gewertet werden, dass *Streptococcus gordonii* DL1 ähnliche Eigenschaften wie *Streptococcus mitis* ATCC9811 aufweist und damit eine stärkere Adhäsionskraft besitzt als *Actinomyces naeslundii* T14V.

Unter der Annahme unterschiedlich starker Adhäsionskräfte der beiden untersuchten Keime erklärt sich die im Vergleich zu *Streptococcus gordonii* DL1 geringere Anzahl an adhärenenten *Actinomyces naeslundii* T14V-Zellen nach 24-stündiger Inkubation damit, dass es unter den durch die permanente Schüttelbewegung bedingten zwar schwachen, aber über einen langen Zeitraum hinweg einwirkenden Abscherkräften zu einer starken Reduktion der zunächst vergleichsweise großen Zahl (DL1 < beide < T14V nach 2,5 Stunden) an adhärenenten *Actinomyces naeslundii* T14V-Zellen gekommen war (24 < 4 < 2,5), während die Adhäsion von *Streptococcus gordonii* DL1 durch die Abscherkräfte nicht nachteilig beeinflusst wurde und sogar zunahm (2,5 = 4 < 24). Unterstützt wird diese Vermutung durch eine Studie von Ding *et al.*, die feststellen, dass zwar die Adhäsion von *Streptococcus gordonii* nicht aber von *Actinomyces naeslundii* durch Abscherkräfte verbessert wird [51].

Auf die unterschiedlich starken Adhäsionskräfte beider Keime kann auch zurückgeführt werden, dass die Biofilme, die bei Ko-Inkubation mit beiden Keimen entstanden waren, den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zufolge fast ausschließlich Streptokokken enthielten, was mit den Ergebnissen anderer Studien übereinstimmt [68, 176]. Zwar konnten Dige *et al.* zeigen, dass *Actinomyces naeslundii* zu morphologischer Vielfalt neigt und insbesondere in jungen Biofilmen häufig kokkoide Gestalt anstatt Stäbchenform annimmt [49], womit die Vermutung aufgestellt werden kann, die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen würden eine Streptokokkendominanz lediglich vortäuschen; jedoch zeigen die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen 2,5 und 4 Stunden alter reiner *Actinomyces naeslundii* T14V-Biofilme eindeutig stäbchenförmige Zellen. Ein Vergleich der quantitativen Entwicklung des gemischten Biofilms und des *Streptococcus gordonii* DL1-Biofilms zeigt zudem, dass in beiden Biofilmen im Verlauf der Zeit eine kontinuierliche Zunahme der Anzahl adhärenenter Zellen stattfindet. Diese Analogie spricht dafür, dass die Zunahme wohl auch in Biofilmen, die bei Ko-Inkubation mit beiden Keimen entstanden waren, von Streptokokken bestimmt war. Im Fall des gemischten Biofilms war die Adhäsion tendentiell (nicht signifikant) etwas stärker ausgeprägt, was auf die wenigen, zusätzlich zu den Streptokokken, adhärenenten Aktinomyzeten zurückgeführt werden kann. Auch Palmer *et al.* zeigten, dass die Biofilmbildung durch *Streptococcus gordonii* DL1 von der Anwesenheit

von *Actinomyces naeslundii* T14V unbeeinflusst bleibt [176]. Für eine hohe Adhäsionskraft von *Streptococcus gordonii* als Ursache für seine Dominanz spricht – unter Beachtung der großen Bedeutung spezifischer Bindungen für die Höhe der Adhäsionskraft [233] –, dass dieser Keim in besonderem Maß eine spezifische Rezeptor-Liganden-Bindung mit  $\alpha$ -Amylase eingeht [206]. So wurde nachgewiesen, dass *Streptococcus gordonii* DL1 10-mal besser an eine mit einer Speichelpellikel bedeckte Oberfläche bindet als *Streptococcus oralis* 34 [132] und schneller bindet als *Streptococcus mutans* [165]. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass auch die Ko-Inkubation von Prüfkörpern, die nicht mit einer Speichelpellikel bedeckt waren, zur Entstehung von Streptokokken-dominierten Biofilmen führte.

Neben einer im Vergleich schwächeren Adhäsion der Aktinomyzeten und damit verbundenen Ablösung zunächst adhärenter Zellen, könnte auch eine bei Ko-Inkubation im Vergleich zur Einzelinkubation verminderte Adhäsion der Aktinomyzeten aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gewählten Inkubationsreihenfolge (zuerst *Streptococcus gordonii* DL1) und der mit der sequentiellen Inokulation einhergehenden unterschiedlich langen Inkubationsdauer beider Keime verantwortlich für das Überwiegen der Streptokokken bei Ko-Inkubation sein. So wurde bisher lediglich für eine zusätzliche Zeit der initialen Adhäsion von 60 Minuten nachgewiesen, dass sie sich nicht auf das Biofilmvolumen auswirkt [68]; in der vorliegenden Arbeit betrug jedoch schon die minimale zusätzliche Inkubationszeit 1,25 Stunden. Bezüglich der Inkubationsreihenfolge konnten Foster und Kolenbrander zwar zeigen, dass *Streptococcus gordonii* DL1 unabhängig von der Inokulationsreihenfolge stets den größten Anteil eines Biofilms darstellt, *Actinomyces naeslundii* T14V also auch dann keinen größeren Anteil annimmt, wenn *Actinomyces naeslundii* T14V vor *Streptococcus gordonii* DL1 inokuliert wird [68]; allerdings stellten Dige et al. fest, dass *Actinomyces naeslundii* in Multilayer-Biofilmen überwiegend in den inneren Regionen des Biofilms zu finden war, was darauf hindeutet, dass dieser Keim bevorzugt an eine „unkontaminierte“ Oberfläche bindet [49]. Damit würde die Inokulationsreihenfolge das Ergebnis der vorliegenden Arbeit erklären, denn durch die zuerst einwirkenden Streptokokken könnten wichtige Bindungsstellen an der Oberfläche bereits besetzt gewesen sein als *Actinomyces naeslundii* T14V inokuliert wurde. Für eine nicht oder nur gering stattfindende Bindung von *Actinomyces naeslundii* T14V an *Streptococcus gordonii* DL1 spricht auch, dass keine Koaggregate festgestellt wurden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass beide Keime an die Substratoberflächen binden konnten, wobei sich im Einfluss der Inkubationszeit indirekt widerspiegelte, dass die Bindung von *Streptococcus gordonii* DL1 eventuell stabiler war und/oder die Vitalität von *Actinomyces naeslundii* T14V mit zunehmender Inkubationsdauer abgenommen hatte. Die Streptokokken-dominanz in den gemischten Biofilmen scheint auf der Inokulationsreihenfolge zu beruhen.

### 5.2.2 Speichelpellikel

Zahlreiche Studien befassten sich mit dem Einfluss der Pellikel auf die bakterielle Adhäsion. Dabei stellten Müller *et al.*, Palmer *et al.* sowie Van der Mei *et al.* bei Untersuchungen *in vitro* fest, dass die Adhäsion von *Streptococcus gordonii* bzw. *Actinomyces naeslundii* durch eine Speichelpellikel gefördert wird [164, 176, 233]. Müller *et al.* und Palmer *et al.* führen ihr Ergebnis auf eine starke Interaktion zwischen multiplen Adhäsinen von *Streptococcus gordonii* bzw. *Actinomyces naeslundii* und Speichelmolekülen zurück. Van der Mei *et al.* bestätigen diese Vermutung, indem sie zeigen konnten, dass spezifische Wechselwirkungen, wie sie zwischen bakteriellen Adhäsinen und Speichelproteinen bestehen, stärker sind als nicht-spezifische Interaktionen, die die Bindung der Bakterienzellen an Oberflächen vermitteln, die keine spezifischen Bindungsstellen besitzen [233].

Vor diesem Hintergrund erscheint das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zunächst widersprüchlich, denn die Simulation der Bildung einer Speichelpellikel war stets mit einer reduzierten Adhäsion (+ < -) der untersuchten Keime verbunden. Zum einen ist jedoch denkbar, dass der verwendete Speichel die Komponenten, die für die Adhäsion von *Streptococcus gordonii* und *Actinomyces naeslundii* über spezifische Adhäsin-Rezeptor Wechselwirkungen erforderlich sind, nicht oder in nicht ausreichendem Maß enthielt. Zum anderen ist zu berücksichtigen, dass eine eingeschränkte Vergleichbarkeit der erwähnten Studien mit der vorliegenden Arbeit besteht, denn sowohl die Feststellungen von Müller *et al.* als auch von Van der Mei *et al.* beruhen auf einem Vergleich speichelkonditionierter Oberflächen mit Oberflächen, die mit Proteinlösungen (HSA (humanes Serumalbumin), Serum, Fibronectin, BSA (bovines Serumalbumin)) behandelt worden waren [164, 233]. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit mit PBS konditionierten „Referenzen“ gearbeitet, was bedeutet, dass es anders als bei Inkubation mit Proteinlösungen [164] nicht zur Adsorption von Proteinen auf den Prüfkörperoberflächen gekommen war. Dass eine mit Proteinlösungen behandelte Oberfläche nicht mit einer unbedeckten (PBS konditionierten) Oberfläche vergleichbar ist, zeigt eine Studie von Pratt-Terpstra *et al.*, in der die Adhäsion verschiedener Streptokokken an BSA konditionierte und nicht vorbehandelte Oberflächen verglichen wurde. Dabei wurde festgestellt, dass die Adhäsion bei BSA Konditionierung deutlich geringer ausfiel als auf unbehandelten Oberflächen [182].

Darüberhinaus stimmen Studien, die wie in der vorliegenden Arbeit die Adhäsion von Bakterien an unbedeckte und speichelkonditionierte Oberflächen verglichen, mit den vorliegenden Ergebnissen überein: sie zeigen, dass die Anwesenheit einer Speichelpellikel zu einer signifikant geringeren bakteriellen Adhäsion führt [28, 84, 204, 230]. Eine mögliche Erklärung für diese Wirkung der Speichelpellikel fanden Mei *et al.* bei kürzlich durchgeführten Untersuchungen zum Vergleich bakterieller Adhäsionskräfte in An- bzw. Abwesenheit einer Speichelpellikel.

Die Adhäsionskraft von Bakterien (darunter verschiedene Streptokokkenarten und *Actinomyces naeslundii* T14V) auf Oberflächen, die nicht mit einer Speichelpellikel bedeckt waren, war fast 10-fach höher als die Adhäsionskraft in Anwesenheit einer Speichelpellikel [155, 156]. Die Anwesenheit einer Speichelpellikel erhöht die Hydrophilie einer Oberfläche. Da Wasserstoffbrücken eine wesentliche Bedeutung für die Retention von Mikroorganismen besitzen und die für ihr Auftreten erforderliche Entfernung von Wasser, welches zwischen Bakterium und Oberfläche vorhanden ist, jedoch leichter erfolgen kann, wenn eine der wechselwirkenden Oberflächen hydrophobe Eigenschaften aufweist, ergeben sich daraus die höheren Adhäsionskräfte in Abwesenheit der Speichelpellikel [156, 157]. Die höhere Adhäsionskraft führt wiederum zu einer höheren Anzahl an Bakterien, da abscherende Kräfte kompensiert werden können [233].

Aufgrund der mit ihrer Anwesenheit verbundenen schwächeren Bindung adhärenter Zellen besitzt die Pellikel *in vivo* in gewisser Weise eine Schutzfunktion, da sie die Akkumulation von Bakterien reduziert [155]. Darüberhinaus ist bezüglich der Bedeutung der Pellikel *in vivo* zu bedenken, dass die unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Speichelproteinen und Oberfläche schneller zu einer Bindung führen als eine spezifische Adhäsion-Rezeptor-Bindung zwischen Oberfläche und Bakterium aufgebaut werden kann [94]. Zwar wurde gezeigt, dass bereits in einer drei Minuten alten initialen Pellikel Bakterien anwesend sind und auf Oberflächen, die intraoral getragen wurden, bereits nach zehn Sekunden Bakterien adhären sind – Bakterien also auch ohne die Anwesenheit einer Schicht aus präadsorbierten Proteinen direkt an Oberflächen binden; jedoch kann man davon ausgehen, dass Speichelproteine als „Gewinner aus dem Rennen um eine Oberfläche“ hervorgehen [93]. Dies bedeutet, dass der Adhäsionsprozess der Bakterien *in vivo* selten in einer Wechselwirkung zwischen „Original“-Oberfläche und Bakterien, sondern meist in einer Wechselwirkung zwischen Bakterien und Pellikel besteht.

Hannig zog daraus die Schlussfolgerung, dass die Pellikel einen größeren Einfluss auf die Adhäsion von Mikroorganismen hat als die Oberflächeneigenschaften (Rauigkeit, Materialchemie/Oberflächenenergie) des Substrats selbst. Weiterhin stellte er bei Untersuchungen *in vivo* fest, dass Oberflächen mit unterschiedlichen Eigenschaften von einer stets gleichartigen Pellikel bedeckt waren. Da er hinsichtlich Menge und Spektrum der adhärenen Keime kaum Unterschiede zwischen Prüfkörpern aus verschiedenen Materialien/unterschiedlichen Rauigkeiten beobachtete, postulierte er, dass durch die Pellikel auf allen pellikelbedeckten Oberflächen die gleiche Ausgangssituation für die Adhäsion von Bakterien entstanden war – die Oberflächeneigenschaften durch die Pellikel also maskiert worden waren [94]. Auch in anderen Studien wurde festgestellt, dass physikochemische Unterschiede zwischen verschiedenen Werkstoffen, z.B. die Oberflächenspannung und die Rauigkeit durch eine Pellikel „nivelliert“ werden [29, 91, 155]. Mei *et al.*, die feststellten, dass die Adhäsionskraft unterschiedlicher Keime in Abwesenheit einer Speichelpellikel an Adhäsivoberflächen im Vergleich zu Metalloberflächen und Schmelz am

stärksten und an letzteren am schwächsten waren, zeigten weiterhin, dass diese Unterschiede in Anwesenheit einer Speichelpellikel nicht mehr bestanden [155].

Eine solche Maskierung der Oberflächeneigenschaften hätte in der vorliegenden Arbeit zur Folge haben müssen, dass zwischen Oberflächen mit verschiedenen Eigenschaften (glatt – rau, Empress – Sinfony – Girobond) in Anwesenheit einer Speichelpellikel keine oder nur geringe, nicht signifikante Unterschiede hinsichtlich der Menge an adhärenenten Keimen hätten festgestellt werden dürfen. Eine solche Wirkung der Speichelpellikel konnte jedoch wie in vielen anderen *in vitro* Untersuchungen nicht beobachtet werden [164, 182, 204]. Eine mögliche Erklärung ist, dass eine *in vitro* gebildete Pellikel einer natürlichen Speichelproteinschicht nicht vollständig entspricht und somit eventuell Oberflächeneigenschaften nicht maskieren kann. Allerdings wurden bei etlichen *in vitro* durchgeführten Studien Rauigkeit und Oberflächenenergie vor und nach der Pellikelbildung bestimmt und Veränderung der Messgrößen nach erfolgter Pellikelbildung festgestellt [155, 156, 164, 182]. Dies bedeutet, dass auch die *in vitro* formierte Pellikel zu einer Modifizierung der Oberflächeneigenschaften geführt hatte. Dass es in diesen Studien zwar zu einer Annäherung der Messwerte von Oberflächenenergie und Rauigkeit verschiedener Oberflächen kam, aber dennoch Unterschiede hinsichtlich dieser Oberflächeneigenschaften bestehen blieben, zeigt zudem, dass die Maskierung durch die Pellikel nicht vollständig erfolgt. Der Einfluss der ursprünglichen Oberflächeneigenschaften bleibt auch in Anwesenheit einer Pellikel erhalten, was als „Shine-Through-Effekt“ bezeichnet wird [85].

Zu diesem kommt es durch eine vom zugrundeliegenden Material abhängige selektive Adsorption von Speichelproteinen [164, 231] oder dadurch, dass adsorbierte Proteine in Abhängigkeit weitreichender Eigenschaften der Festkörperoberfläche wie Oberflächenenergie, Oberflächenstruktur und Ladung spezifischen Konformationsänderungen unterliegen, die dann die nachfolgenden Interaktionen zwischen Proteinen und Bakterien beeinflussen können [94], vor allem, wenn es sich bei den betroffenen Strukturen um bakterielle Rezeptoren oder aktive Zentren von Enzymen handelt [91] (siehe Kap. 5.2.4). Hahnel *et al.* konnten zeigen, dass sich die freien Oberflächenenergien verschiedener Polymere erst nach deren Bedeckung mit einer Speichelpellikel signifikant unterscheiden, was auf eine Adsorption unterschiedlicher Speichelkomponenten an die verschiedenen Substrate zurückzuführen ist [85] und zugleich den Transfer der Oberflächeneigenschaften durch die Pellikel zeigt. Auch wenn in der vorliegenden Arbeit die Bestimmung der Oberflächeneigenschaften nur vor der Pellikelbildung durchgeführt wurde und somit ein Vergleich mit den Oberflächeneigenschaften der pellikelbedeckten Prüfkörper nicht möglich ist, ist es naheliegend, dass der „Shine-Through-Effekt“ zu den vorliegenden Ergebnissen beigetragen hat. So kann mit diesem Effekt erklärt werden, dass es in der vorliegenden Arbeit nicht nur in Abwesenheit sondern auch in Anwesenheit einer Speichelpellikel zu einer unterschiedlich starken Kolonisierung der verschiedenen Materialien kam. Für ein „Durchscheinen“ der



Oberflächeneigenschaften spricht auch, dass die untersuchten Keime sowohl in An- als auch in Abwesenheit einer Pellikel an Empress am geringsten und an Sinfony am meisten adhärten. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Anwesenheit einer Speichelpellikel generell zu einer reduzierten Adhäsion der untersuchten Keime führte. Dies könnte in einer verringerten Adhäsionskraft der adhärenen Zellen und einer damit verbundenen leichteren Ablösung derselben in Anwesenheit einer Pellikel oder in einer Maskierung adhäsionsfördernder Oberflächeneigenschaften der untersuchten Substrate durch die aufgelagerte Pellikel begründet sein. Eine vollständige Maskierung der die Adhäsion beeinflussenden Faktoren bestand jedoch nicht („Shine-Through-Effekt“).

### 5.2.3 Oberflächenrauigkeit

Nach allgemeiner Ansicht nimmt die Oberflächenrauigkeit starken Einfluss auf die Adhäsion von Bakterien [20, 21]: Diese scheint unabhängig vom Material durch raue Oberflächen begünstigt zu sein [21, 29, 91, 95]. So weisen raue Oberflächen eine bezüglich Dicke, Fläche und CFU's („colony forming units“) stärkere Plaqueakkumulation auf, wobei dieser Biofilm bei mehrtägigem Wachstum verhältnismäßig viele pathogene Mikroorganismen wie Spirochäten und bewegliche Bakterien enthält [21, 231].

Die verstärkte Plaqueakkumulation auf rauen Oberflächen ist unter anderem darin begründet, dass die mechanische Retention der Mikroorganismen vor allem für die erste Phase des Adhäsionsprozesses eine gegenüber spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungen dominierende Rolle spielt [94]. Besonders in Regionen mit ausgeprägten Flüssigkeitsbewegungen oder mechanisch-abrasiver Einwirkung bilden Oberflächenirregularitäten den Ausgangspunkt für die Adhäsion von Mikroorganismen auf Festkörperoberflächen, da sie einen erhöhten Schutz gegenüber dem Einfluss abscherender Kräfte bieten [20, 21, 94, 231] und den Bakterien so genügend Zeit für die irreversible Anheftung zur Verfügung steht [20, 231], wohingegen auf glatten Flächen anhaftende Zellen durch einwirkende Abscherkräfte wieder gelöst werden können. Dementsprechend adhärten Bakterien zwar auch an glatte Oberflächen der natürlichen Zähne; sie neigen jedoch zur Anlagerung im Bereich lokaler Oberflächenirregularitäten wie Perikymatien, Prismendellen, Abrasionsdefekten und Mikrogrübchen [94]. Weitere Gründe für die stärkere Kolonisierung von rauen Oberflächen sind die bei höherer Rauigkeit um den Faktor 2 bis 3 vergrößerte Fläche, die für die Adhäsion von Mikroorganismen zur Verfügung steht, sowie die erschwerte Selbstreinigung und mechanische Reinigung durch Zahnbürste und andere Hilfsmittel [188, 231]. Zudem resultiert der größte Teil der Plaquemenge aus dem Wachstum der initial adhärtenen Keime und somit indirekt auch aus der Rauigkeit [20]. Der *in vivo* bestehende Zusammenhang zwischen der Rauigkeit einer Oberfläche und ihrer Kolonisierung mit Mikroorganismen wurde

auch bei Untersuchungen *in vitro* u.a. von Bürgers *et al.*, Müller *et al.* und Lee B.C. *et al.* nachgewiesen [34, 139, 164].

Vor diesem Hintergrund erscheint es zunächst überraschend, dass sich die relative Menge an adhärenenten Keimen in der vorliegenden Arbeit nur in wenigen Fällen signifikant zwischen Prüfkörpern aus rauem und glattem Palapress unterschied und dabei die glatten Oberflächen stärker kolonisiert waren als die rauen ( $P_r \leq P_g$ ). Allerdings ist zu beachten, dass die Ergebnisse der genannten Studien nur eingeschränkt mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind. So wurde von Lee B. C. *et al.* die Adhäsion von *Streptococcus sanguis* an glatte Titan- und Keramikoberflächen der Adhäsion an raue Kunststoffoberflächen gegenübergestellt. Dies bedeutet, dass die von Lee B.C. *et al.* festgestellte stärkere Adhäsion an die Kunststoffoberfläche nicht eindeutig auf deren höhere Rauigkeit zurückgeführt werden kann, da auch andere Faktoren wie beispielsweise verschiedene Oberflächenenergien der untersuchten Materialien die Adhäsion beeinflussen können [139]. Die von Müller *et al.* verglichenen unterschiedlich rauen Oberflächen waren zwar wie in der vorliegenden Arbeit aus dem gleichen Material gefertigt, jedoch war der Rauigkeitsunterschied deutlich höher. Während dieser bei Müller *et al.* 1,68  $\mu\text{m}$  (rau: 1,72  $\mu\text{m}$ / glatt: 0,04  $\mu\text{m}$ ) betrug [164], bestand in der vorliegenden Arbeit lediglich ein Unterschied von 0,58  $\mu\text{m}$  bzw. 0,35  $\mu\text{m}$  (rau: 0,65  $\mu\text{m}$  bzw. 0,42  $\mu\text{m}$ / glatt: 0,07  $\mu\text{m}$ ). Es ist denkbar, dass dieser Unterschied zu gering war, um sich in der Menge an adhärenenten Zellen bemerkbar zu machen. Auch Lee S.P. *et al.*, die bei Untersuchungen *in vitro* keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Rauigkeit und der Adhäsion von *Streptococcus mutans* nachweisen konnten, erklären dies damit, dass der Rauigkeitsunterschied zwischen den von ihnen untersuchten Materialien zwar statistisch signifikant war, mit 0,5  $\mu\text{m}$  jedoch relativ gering ausfiel [140]. Quirynen beschreibt ebenfalls, dass bei vergleichbaren Rauigkeiten (rau: 1,4  $\mu\text{m}$ / glatt: 0,8  $\mu\text{m}$ ) vernachlässigbare Unterschiede im Ausmaß der Bakterienadhäsion zu verzeichnen sind [188]. Auch Bollen fand beim Vergleich rauer und glatter Oberflächen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Bakterienadhäsion, obwohl deren Rauigkeiten eine deutlich größere Differenz aufwiesen als in der vorliegenden Arbeit (rau: 1,5  $\mu\text{m}$ / glatt: 0,21  $\mu\text{m}$ ) [21]. Andererseits konnten Bürgers *et al.*, in deren Studie der Rauigkeitsunterschied mit 0,8  $\mu\text{m}$  (rau: 0,95  $\mu\text{m}$ / glatt: 0,15  $\mu\text{m}$ ) zwar größer als in der vorliegenden Arbeit, jedoch deutlich geringer als bei Bollen *et al.* war, feststellen, dass *Streptococcus sanguinis* an raue Titanoberflächen stärker adhärierte als an glattes Titan [34].

In diesem Zusammenhang muss jedoch berücksichtigt werden, dass von Bollen *et al.* gezeigt wurde, dass sich die Rauigkeit einer Titanoberfläche erst ab einem Schwellenwert von 0,2  $\mu\text{m}$  auf die Bakterienadhäsion auswirkt [21]. Das bedeutet, dass bei einem Vergleich von zwei Titanoberflächen, die zwar eine unterschiedlich hohe Rauigkeit aufweisen, diese jedoch in beiden Fällen den Grenzwert unterschreitet, kein Unterschied hinsichtlich der Bakterienadhäsion an

diese Oberflächen auftritt; wenn eine der beiden Oberflächen wie bei Bürgers *et al.* den Grenzwert überschreitet, ist hingegen eine stärkere Kolonisierung der rauen Oberfläche zu erwarten. Unter der Annahme, man könne die Existenz dieses Schwellenwertes auf andere Materialien übertragen, war aufgrund der deutlichen Unter- bzw. Überschreitung des Schwellenwertes in der vorliegenden Arbeit – die Rauigkeit der glatten Kunststoffoberflächen betrug  $0,07\text{ }\mu\text{m}$ , die der rauen  $0,42\text{ }\mu\text{m}$  bzw.  $0,65\text{ }\mu\text{m}$  – zu erwarten gewesen, dass sich der (geringe) Rauigkeitsunterschied in der Adhäsion der untersuchten Keime widerspiegelt. Dass dies nicht der Fall war spricht zum einen dafür, dass die Angabe eines Schwellenwerts möglicherweise nur materialspezifisch erfolgen kann. Zum anderen ist zu beachten, dass die Untersuchungen von Bollen *et al. in vivo* und somit unter dynamischen Bedingungen durchgeführt wurden. Dies ist von Bedeutung, denn der die Bakterienadhäsion fördernde Einfluss der Rauigkeit macht sich erst dann bemerkbar, wenn ablösende Kräfte wirken, vor deren Einwirkung die adhärenen Bakterien durch ihren Aufenthalt in Oberflächenirregularitäten geschützt sind [20, 21, 94, 231]: der Schutz, den die Oberflächenrauigkeit bietet, beruht zum einen darauf, dass die  $0,5$  bis  $10\text{ }\mu\text{m}$  großen Bakterien im Profil der Oberfläche verschwinden, wenn sie in Rillen, Mikrogrübchen und ähnlichem adhäreren, und ablösende Kräfte somit keinen Angriffspunkt finden [20, 21]. Weiterhin wurde von Mei *et al.* gezeigt, dass die Adhäsionskraft zwischen adhärentem Bakterium und Oberfläche mit zunehmender Rauigkeit steigt und der Ablösung dementsprechend mehr Widerstand entgegengesetzt werden kann [156].

In der vorliegenden Arbeit wurden zwar ebenfalls ablösende Kräfte wirksam, jedoch waren diese schwächer als es *in vivo* bzw. unter dynamischen Bedingungen der Fall ist [34]. Es ist also möglich, dass der Einfluss der Rauigkeit auf die Adhäsion der untersuchten Keime in der vorliegenden Arbeit aufgrund der semistatischen Bedingungen nicht zur Geltung kommen konnte. Auch Hahnel *et al.*, die in einer ihrer Studien *in vitro* unter semistatischen Bedingungen keine Korrelation zwischen der über  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  liegenden Rauigkeit von Palapress und der Adhäsion von *Candida albicans* feststellten, geben an, dass es unter Einwirkung stärkerer Abscherkräfte eventuell zu einem anderen Ergebnis gekommen wäre [88].

Auch die Tatsache, dass in den wenigen Fällen, in denen eine signifikant unterschiedliche Kolonisierung rauer und glatter Prüfkörperoberflächen festgestellt werden konnte, **die glatten Oberflächen eine stärkere Bakterienadhäsion aufwiesen ( $P_r \leq P_g$ )**, erscheint zunächst überraschend. Allerdings konnte auch von Hahnel *et al.* festgestellt werden, dass *Candida albicans* an Prüfkörper aus Palapress mit einer Rauigkeit von  $0,68\text{ }\mu\text{m}$  weniger stark adhärte als an Prüfkörper aus Palapress mit einer Rauigkeit von  $0,31\text{ }\mu\text{m}$  bzw.  $0,05\text{ }\mu\text{m}$  [88]. Kawai *et al.* zeigten in einer Studie zur Untersuchung der Bakterienadhäsion an Keramik ebenfalls, dass die stärkste Plaqueansammlung auf gebrannten Oberflächen gefunden wurde obwohl diese glatter waren als Keramikoberflächen, die poliert worden waren [127]. Auch Poggio *et al.* fanden beim Vergleich

der Adhäsion von *Streptococcus mutans* an verschiedene Komposite teilweise mehr Zellen auf glatten als auf rauen Oberflächen [179]. In diesem Zusammenhang ist – wie in Kapitel 5.1.2 bereits angesprochen – zu berücksichtigen, dass die Charakterisierung der untersuchten Oberflächen hinsichtlich ihrer Rauigkeit in der vorliegenden Arbeit genauso wie in den genannten Studien lediglich anhand des Mittenrauwerths  $R_a$  erfolgte, während von Bollen *et al.* empfohlen wird zur genaueren Erfassung des Oberflächenprofils weitere Oberflächenkenngrößen wie die mittlere Höhe der größten Profilsitzen innerhalb einer Einzelmessstrecke  $R_{pm}$  oder die mittlere Rillenbreite  $R_{sm}$  zu erfassen [20]. Es ist also denkbar, dass die glatten Oberflächen zwar einen geringeren  $R_a$ -Wert aufwiesen als die rauen Oberflächen, aber in ihrem Profil dennoch (nicht erfasste) Irregularitäten vorhanden waren, die zur Adhäsion von Bakterien beitrugen. So konnten Verran und Maryan nachweisen, dass Zellen in Unterschnitten vorhanden sind, die mittels Taststiftverfahren nicht erfasst werden können, jedoch einen idealen Ort für die Adhäsion von Bakterien darstellen. Dementsprechend konnten Verran und Maryan beobachten, dass Bakterien auf glatten Oberflächen häufig klümpchenförmig um und in Oberflächendefekten zu finden sind [239]. Auch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der vorliegenden Arbeit zeigen keine gleichmäßige Verteilung sondern konzentrierte Ansammlungen der adhären Zellen.

Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Rauigkeit einer Oberfläche um mehr als  $0,1\text{ }\mu\text{m}$  – wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war – zu einer Änderung ihrer freien Oberflächenenergie führen kann [32], deren Einfluss auf die Bakterienadhäsion in zahlreichen Studien (siehe Kap. 5.2.4) nachgewiesen wurde [91, 188, 231]. Eine Änderung der freien Oberflächenenergie bei Erhöhung der Oberflächenrauigkeit ist über veränderte Werte bei Bestimmung des Kontaktwinkels erfassbar. Die Auswirkung einer erhöhten Oberflächenrauigkeit auf den Kontaktwinkel bzw. die freie Oberflächenenergie ist vom Kontaktwinkel der ursprünglichen Oberfläche abhängig: war er kleiner als  $60^\circ$  sinkt er durch das Erhöhen der Rauigkeit, war er größer als  $86^\circ$  steigt er. Bei Kontaktwinkeln zwischen  $60^\circ$  und  $86^\circ$  hat die Erhöhung der Rauigkeit keinen Einfluss auf den Kontaktwinkel bzw. die freie Oberflächenenergie [32]. Diese Zusammenhänge wurden insbesondere für Polymere nachgewiesen, zu denen auch Palapress zählt. Zwar wurde in der vorliegenden Arbeit weder der Kontaktwinkel bzw. die freie Oberflächenenergie der glatten noch der rauen Palapressoberflächen bestimmt, was zur Folge hat, dass die Korrelation der freien Oberflächenenergie von Palapress mit dessen Oberflächenrauigkeit nicht beurteilt werden kann, jedoch ist denkbar, dass durch die Erhöhung der Rauigkeit eine Oberfläche mit einer niedrigeren freien Oberflächenenergie und damit einer geringeren Neigung zur Akkumulation der untersuchten Keime entstanden war.

Insgesamt betrachtet kann die mangelnde Korrelation der Oberflächenrauigkeit und der Adhäsion der untersuchten Keime auf einen zu geringen Rauigkeitsunterschied und die schwachen

ablösenden Kräfte, die mit der semistatischen Versuchsdurchführung einhergehen, zurückgeführt werden. Um zu klären, weshalb raue Oberflächen eine geringere Bakterienadhäsion aufwiesen als glatte Oberflächen, könnte eine erweiterte Bestimmung des Oberflächenprofils und eine Bestimmung der Oberflächenenergie rauer und glatter Oberflächen hilfreich sein.

#### 5.2.4 Werkstoffchemie und freie Oberflächenenergie

In Bezug auf die Frage, durch welche Faktoren die Adhäsion von Mikroorganismen an zahnärztliche Restaurationsmaterialien beeinflusst wird, wird der Rauigkeit im Allgemeinen ein großer Stellenwert beigemessen [94, 187]. So wird die vielfach festgestellte geringe Bakterienadhäsion an keramische Oberflächen, die teilweise sogar geringere Plaquemengen aufweisen als natürliche Zahnhartsubstanz, häufig auf ihre dichte, harte und glatte Oberfläche zurückgeführt [29, 71]; die Zunahme der Oberflächenrauigkeit nach längerer intraoraler Verweilzeit von Kompositrestaurationen soll ein ursächlicher Faktor für die erhöhte Plaqueakkumulation auf Kompositoberflächen sein [91, 94]. Eine *in vitro* durchgeführte Studie von Hahnel *et al.* an künstlich gealterten Kompositen weist allerdings darauf hin, dass die Rauigkeit moderner Komposite während ihres klinischen Einsatzes wohl nur geringfügig zunimmt [84]. Die Bedeutung der Rauigkeit für die Adhäsion von Mikroorganismen wird zudem dadurch relativiert, dass in zahlreichen Studien festgestellt wurde, dass zwischen Oberflächen, die zwar die gleiche Rauigkeit aufweisen, aber aus unterschiedlichen Werkstoffen gefertigt sind, Unterschiede hinsichtlich ihrer Kolonisierung mit Bakterien auftreten [91, 95, 231]. Dies gilt sowohl für den Vergleich verschiedener Werkstoffgruppen – so wurden beispielsweise von Scarano *et al.* auf Zirkonoxid signifikant weniger Bakterien gefunden als auf Titan [207] –, als auch für den Vergleich verschiedener Vertreter einer Werkstoffgruppe, wie Hahnel *et al.* bei einer Untersuchung unterschiedlicher Komposite zeigen konnten [84]. Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, dass auch die Werkstoffchemie (chemische Zusammensetzung/Aufbau) eines Materials beeinflusst wie stark es von Mikroorganismen kolonisiert wird. Untersuchungen von Müller *et al.* zur Adhäsion verschiedener Streptokokken-Arten an Siliziumscheiben gleicher Rauigkeit, die jedoch mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen modifiziert worden waren, bestätigen die Abhängigkeit des Adhäsionsmusters oraler Keime von der Werkstoffchemie [164].

Wie bei Sardin *et al.*, die die Adhäsion verschiedener Streptokokken-Arten an Metall- und Keramikoberflächen mit der Zielsetzung untersuchten, ausschließlich die Bedeutung der Eigenschaften und der Zusammensetzung eines Materials für die Bakterienadhäsion beurteilen zu können [203], wurde in der vorliegenden Arbeit beim Vergleich von Empress, Sinfony und Girobond ein möglicher Einfluss der Rauigkeit ausgeschlossen, indem alle Oberflächen die gleiche Rauigkeit aufwiesen. Der Vergleich zeigte, dass die untersuchten Keime an Empress signifikant

weniger adhärten als an Girobond und an dieses wiederum signifikant weniger als an Sinfony ( $E < G < S$ ), womit die Bedeutung der Werkstoffchemie bzw. der durch sie bedingten Eigenschaften einer Oberfläche für die Adhäsion von Bakterien an eine solche bekräftigt wird. Im Einklang damit steht auch die im Vergleich zu Palapress geringere Adhäsion der untersuchten Keime an Glas, denn Glas ist wie Empress überwiegend aus  $\text{SiO}_2$  aufgebaut, Palapress zählt wie Sinfony zu den Kunststoffen.

Eine Materialeigenschaft, die durch die chemische Zusammensetzung eines Werkstoffs bestimmt wird, ist die Oberflächenenergie [85, 125, 147]. So konnten Hahnel *et al.* zeigen, dass die Hydrophobizität – welche aus der Oberflächenenergie resultiert [251] – bei Kompositen auf Siloran-Basis aufgrund ihres hydrophoben Siloxan-Grundgerüsts einen signifikant höheren Wert aufweist als bei Methacrylat-basierten Kompositen, die eine weniger hydrophobe Matrix besitzen [84]. Die Bedeutung der Oberflächenenergie eines Materials für die Adhäsion von Bakterien wurde vielfach untersucht, wobei häufig ein signifikanter Zusammenhang zwischen der freien Oberflächenenergie eines Substrats und seiner bakteriellen Besiedelung festgestellt wurde [91, 140, 188, 231]: Oberflächen mit hoher freier Oberflächenenergie (hydrophile Oberflächen [251]) weisen eine stärkere und schnellere [165] Kolonisierung auf als Oberflächen mit geringer freier Oberflächenenergie (hydrophobe Oberflächen [251]); dementsprechend konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der freien Oberflächenenergie, wie sie durch Auftragen von Silikonöl auf Zähne stattfinden kann, die Plaquebildung signifikant reduziert [231].

Eine mögliche Ursache für die geringere Kolonisierung niedrigerenergetischer Oberflächen liegt laut Hannig darin, dass es bei der Adhäsion von Biomolekülen an eine derartige Oberfläche zu einem geringen Entropiegewinn kommt, die Pellikelbildung somit weniger begünstigt ist und der Adhäsion von Mikroorganismen damit ihre Grundlage entzogen wird [95]; zum anderen wirkt sich die freie Oberflächenenergie eines Substrats insofern entscheidend auf die Pellikelbildung aus, als dass sie gemeinsam mit der Oberflächenladung der bestimmende Faktor für das Ausmaß der Konformationsänderungen ist, denen die Proteine bei der Adsorption unterliegen [91, 94]. Indem durch die Entfaltung der hydrophobe Kern der Proteine freigelegt wird, ermöglichen die Konformationsänderungen hydrophobe Wechselwirkungen, die feste irreversible Bindungen darstellen, die zu einer „zähen“ Bindung der Pellikel an ihre Unterlage beitragen [91, 94]. Von Baier konnte gezeigt werden, dass Proteine bei der Adsorption an eine Oberfläche mit einer relativ geringen Oberflächenenergie von 22 bis 24  $\text{mJ/m}^2$  das geringste Ausmaß an Konformationsänderung und Denaturierung zeigen und somit nur eine schwache Bindung an eine derartige Oberfläche erfolgen kann [13]. Die Folge der geringen Kohäsivität der Pellikel auf Oberflächen mit niedriger Oberflächenenergie ist ihre leichtere Ablösung vom Substrat und die damit verbundene geringere Plaqueakkumulation [31, 91, 231]. Eine Untersuchung von Christersson und Dunford bestätigt, dass Pellikel auf Oberflächen mit niedriger Oberflächenenergie signifikant

dünnere sind als Pellikel auf Oberflächen mit hoher Oberflächenenergie [41]. Auch Hannig *et al.* konnten bei einem Vergleich der Pellikeldicke auf Titan und einem Nanofüller-Komposit mit geringer freier Oberflächenenergie auf dem Komposit eine signifikant dünnere Pellikel finden, was sie mit der geringen „Zähigkeit“ der Pellikel auf dieser niedrigerenergetischen Oberfläche und der damit verbundenen „Selbstreinigungsfunktion“ erklären [97].

Um Aussagen über die Bedeutung der freien Oberflächenenergie für die Adhäsion der untersuchten Keime an die in der vorliegenden Arbeit verglichenen Materialien treffen zu können, wurde die freie Oberflächenenergie von Empress, Sinfony und Girobond bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl der disperse Anteil der freien Oberflächenenergie als auch die totale freie Oberflächenenergie von Empress und Sinfony signifikant höher war als von Girobond. Im Vergleich zeigte Empress eine höhere totale freie Oberflächenenergie und eine höhere disperse sowie polare Komponente als Sinfony, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant ( $G < S \leq E$ ). Dass in anderen Untersuchungen, in denen ebenfalls die freie Oberflächenenergie von Kunststoffen, metallischen und keramischen Werkstoffen – allerdings anhand anderer Vertreter – verglichen wurde, teilweise eine andere „Reihenfolge“ der verschiedenen Werkstoffgruppen hinsichtlich ihrer freien Oberflächenenergie festgestellt wurde [56] stellt keinen Widerspruch dar, sondern bestätigt, dass die Oberflächenenergie eine Größe ist, die auf der Materialchemie einer Substanz beruht [140].

Unter Beachtung der oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen der freien Oberflächenenergie einer Oberfläche und ihrer Kolonisierung erscheint es jedoch überraschend, dass die untersuchten Keime trotz der vergleichsweise hohen Oberflächenenergie von Empress ( $G < S \leq E$ ) an dieses Material am wenigsten adhärten ( $E < G < S$ ). Allerdings kamen andere Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen. So stellten Hahnel *et al.* und Rosentritt *et al.*, die *in vitro* untersuchten inwieweit sich verschiedene Keramiken in ihren Oberflächeneigenschaften unterscheiden und inwieweit sich diese auf die Adhäsion verschiedener Streptokokken auswirken, fest, dass sich die Keramiken zwar hinsichtlich Parametern wie Rauigkeit und Oberflächenenergie unterscheiden, die Korrelation dieser Oberflächeneigenschaften mit der bakteriellen Adhäsion jedoch gering ausfiel [87,194]. Auch die Untersuchung der Adhäsion von *Candida albicans* bzw. *Streptococcus mutans* an verschiedene Kunststoffe *in vitro* durch Bürgers *et al.* und Hahnel *et al.* ergab keinen Zusammenhang zwischen Oberflächenenergie und Adhäsion [36,85,88]. Weiterhin konnten Bürgers *et al.* keinen Zusammenhang zwischen der freien Oberflächenenergie verschiedenartiger Titanoberflächen und der Adhäsion von *Streptococcus sanguinis* feststellen [34].

Die mangelnde Korrelation kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist zu beachten, dass die Bedeutung der Oberflächenenergie eines Materials für die Adhäsion von Mikroorganismen vor allem über eine Beeinflussung der Pellikelhaftung am zugrundeliegenden Substrat und der damit verbundenen mehr oder weniger starken Ablösung der Pellikel durch Abscherkräfte (vgl.

oben) zum Tragen kommt. Bei Untersuchungen *in vitro*, die unter semistatischen Bedingungen durchgeführt werden, kann sich der Einfluss der Oberflächenenergie aufgrund relativ schwacher Abscherkräfte eventuell weniger bemerkbar machen als es *in vivo* der Fall ist. Dafür spricht, dass die Studien von Bürgers *et al.*, Hahnel *et al.* und Rosentritt *et al.*, in denen keine Korrelation zwischen freier Oberflächenenergie und Adhäsion der jeweils untersuchten Keime festgestellt wurde, unter (semi)statischen Bedingungen erfolgten. Abgesehen davon, dass in der vorliegenden Arbeit die freie Oberflächenenergie anhand unbedeckter Prüfkörper bestimmt wurde, die freie Oberflächenenergie sich jedoch durch die Bildung einer Pellikel ändern kann [188] und somit genaugenommen keine Aussage über die Korrelation von freier Oberflächenenergie und Adhäsion der untersuchten Keime an die pellikelbedeckten, sondern nur über die Korrelation von freier Oberflächenenergie und Adhäsion an die unbedeckten Prüfkörper getroffen werden kann, wäre eine Begründung der mangelnden Korrelation von freier Oberflächenenergie und Adhäsion der untersuchten Keime mit den geringen Abscherkräften und der daraus resultierenden geringeren Auswirkung der Pellikelzähigkeit ohnehin nur für die pellikelbedeckten, nicht aber für die unbedeckten Prüfkörper möglich. Dies zeigt, dass in der vorliegenden Arbeit andere Ursachen für die mangelnde Korrelation vorliegen müssen.

So deuten Untersuchungen von Boulange-Petermann *et al.* und Sardin *et al.* darauf hin, dass nicht die totale freie Oberflächenenergie, sondern das Verhältnis der dispersen zur polaren Komponente der freien Oberflächenenergie bzw. die disperse Komponente mit der Adhäsion von Bakterien an eine Oberfläche korrelieren [23, 203]. Sardin *et al.* werten dies als Hinweis darauf, dass vor allem Van-der-Waals Kräfte bedeutsam für den Adhäsionsprozess sind [203]. In der vorliegenden Arbeit konnte ein solcher Zusammenhang allerdings nicht festgestellt werden, was in Übereinstimmung mit einer Untersuchung von Hahnel *et al.* [85] steht. Interessanterweise bestand in der vorliegenden Arbeit eine negative Korrelation zwischen den polaren Komponenten der untersuchten Materialien und der Adhäsion der untersuchten Keime: an Sinfony, welches die geringste polare Komponente aufwies, erfolgte die Adhäsion am stärksten, an Empress, welches die höchste polare Komponente aufwies, am schwächsten. Die Unterschiede zwischen den polaren Komponenten der verschiedenen Materialien waren zwar nicht signifikant, dennoch kann vermutet werden, dass die untersuchten Keime unpolare Oberflächeneigenschaften aufweisen und somit bevorzugt an unpolares Sinfony adhärten.

In diesem Zusammenhang und auch im Hinblick auf die mangelnde Korrelation zwischen freier Oberflächenenergie und Adhäsion der untersuchten Keime in der vorliegenden Arbeit ist weiterhin zu erwähnen, dass von zahlreichen Autoren gezeigt werden konnte, dass auch die Oberflächenenergie der adhärierenden Keime eine wesentliche Rolle für ihre Adhäsion an verschiedene Oberflächen spielt [146, 188, 203, 205, 244]. So adhäreren Bakterien mit niedriger freier Oberflächenenergie bevorzugt an Substrate, die eine niedrige freie Oberflächenenergie aufweisen



und Bakterien mit hoher freier Oberflächenenergie bevorzugt an Materialien mit hoher freier Oberflächenenergie [182,231]. In Bezug darauf scheint die zu Beginn dieses Kapitels dargestellte und von vielen Studien bestätigte Aussage, Oberflächen mit hoher freier Oberflächenenergie würden generell eine stärkere Kolonisierung aufweisen als Oberflächen mit geringer freier Oberflächenenergie, widersprüchlich. Eine Ungültigkeit dieser Aussage würde auch erklären, dass in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen der freien Oberflächenenergie und der Adhäsion der untersuchten Keime festgestellt wurde. Es ist jedoch zu bedenken, dass die meisten oralen Bakterien eine hohe freie Oberflächenenergie besitzen [188,238] und die von vielen Autoren formulierte Schlussfolgerung, die Adhäsion von Bakterien würde umso leichter erfolgen je höher die freie Oberflächenenergie des zugrundeliegenden Substrats ist [91,140,188,231], deshalb *in vivo* berechtigt ist. Andererseits bedeutet dies auch, dass bei Untersuchungen *in vitro*, bei denen nur mit einem oder – wie in der vorliegenden Arbeit – wenigen Bakterien gearbeitet wird, die nicht zwangsläufig eine hohe freie Oberflächenenergie besitzen müssen, der Zusammenhang zwischen hoher freier Oberflächenenergie einer untersuchten Oberfläche und ausgeprägter Adhäsion der untersuchten Keime nicht gelten muss. Die freie Oberflächenenergie der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Keime *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V wurde zwar nicht bestimmt; es ist jedoch denkbar, dass ihre Oberflächenenergie in einer Größenordnung liegt, die derjenigen von Sinfony entspricht und deshalb die Adhäsion an dieses Material am ausgeprägtesten erfolgte. Allerdings wäre aufgrund des signifikanten Unterschieds der freien Oberflächenenergie von Sinfony und Girobond und des nicht signifikanten Unterschieds der freien Oberflächenenergie von Sinfony und Empress ( $G < S \leq E$ ) zu erwarten, dass Girobond und nicht Empress die geringste Adhäsion aufweist. Dass die untersuchten Keime dennoch an Empress am schwächsten adhärierten weist darauf hin, dass es neben der freien Oberflächenenergie weitere (materialspezifische) Faktoren gibt, die in der vorliegenden Arbeit zwar nicht untersucht wurden, für die schwache Adhäsion von *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V an Empress und die starke Adhäsion an Sinfony aber (mit)verantwortlich sein könnten.

Zu diesen Faktoren bzw. Materialeigenschaften zählt beispielsweise das Zeta-Potential und die daraus resultierende Ladung eines Bakteriums bzw. einer Oberfläche. Obwohl eine hohe Oberflächenladung eines Bakteriums gewöhnlich damit assoziiert ist, dass es sich um einen hydrophilen Keim handelt [161], ist die Oberflächenladung als isolierter Einflussfaktor für die Bakterienadhäsion zu betrachten. So können zum einen auch hydrophobe Bakterien eine hohe Oberflächenladung tragen [161], zum anderen konnten Satou *et al.* zeigen, dass die Adhäsion von Keimen an eine Oberfläche nicht nur von der Hydrophobizität, sondern auch vom Zeta-Potential sowohl der Keime als auch der Oberflächen abhängig ist, wobei Oberflächen mit einem schwach negativen Zeta-Potential eine stärkere Kolonisierung aufweisen als solche mit stark ne-

gativem Zeta-Potential. Sie erklären dies damit, dass die meisten Keime eine negativ geladene Oberfläche besitzen und dementsprechend beim Adhäsionsvorgang repulsive elektrostatische Interaktionen mit der zugrundeliegenden Oberfläche auftreten [205]. In Übereinstimmung damit stellten Reynolds und Wong eine reduzierte Adhäsion von *Streptococcus mutans* an Hydroxylapatitoberflächen fest, nachdem deren negative Ladung durch Adsorption saurer Proteine erhöht worden war, da es aufgrund der negativen Ladung der beiden wechselwirkenden Oberflächen zu einer verstärkten Abstoßung kam [191]. In diesem Zusammenhang spielt auch die Ionenstärke der Lösung, die die wechselwirkenden Oberflächen umgibt, eine Rolle. So wurde von Busscher *et al.* gezeigt, dass *Streptococcus mutans* LT11 und *Streptococcus intermedius* NCTC11324 in PBS mit hoher Ionenstärke ungeladene Oberflächen besitzen, während sie in PBS mit niedriger Ionenstärke eine negative Ladung tragen und dementsprechend mit geringerer Kraft am zugrundeliegenden Substrat adhäreren [30]. Es ist nicht auszuschließen, dass die Adhäsion der untersuchten Keime auch in der vorliegenden Arbeit durch das Suspensionsmedium PBS beeinflusst wurde, dessen Ionenstärke allerdings nicht bestimmt wurde.

Zahlreiche Studien, die wie die vorliegende Arbeit eine unterschiedlich starke Adhäsion von Mikroorganismen an Metall, Keramik und Kunststoff feststellten [55, 126, 163, 195, 225, 230], lassen weiterhin vermuten, dass die Adhäsion durch Werkstoffgruppen-spezifische Eigenschaften beeinflusst wird, die im prinzipiell unterschiedlichen chemischen Aufbau und der unterschiedlichen Zusammensetzung von Metallen, Keramiken und Kunststoffen begründet sind. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Freisetzung von Ethylenglykoldimethacrylat (EGDMA) und Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA), die Bestandteil vieler Composite sind, das Wachstum kariogener Bakterien wie Streptokokken und Laktobazillen begünstigt [29]. Kalichi *et al.* konnten nachweisen, dass Triethylenglykol (TEG) ebenfalls wachstumsfördernde Wirkung zeigt, während Methacrylsäure eine Wachstumshemmung bewirkt [128]. Metallischen Werkstoffen werden antibakterielle Eigenschaften durch die Freisetzung von Metallionen nachgesagt, wodurch sie eine Hemmung der Plaqueakkumulation und des bakteriellen Wachstums bewirken können sollen [94, 231]. Da tote Bakterien durch die Freisetzung intrazellulärer Lektine die Adhäsion lebender Bakterien fördern [186], würde die Freisetzung toxischer Metallionen erklären, wie die von Busscher *et al.* beschriebenen dicken aber wenig lebendigen Biofilme auf Amalgam entstehen [29]. Hannig *et al.* können die These, einer antibakteriellen Wirkung der metallischen Werkstoffe, allerdings nicht bestätigen, da sie davon ausgehen, dass die Pellikel den Ionenfluss hemmt [94]. Andere Studien hingegen sprechen für eine antibakterielle Wirkung, z.B. konnte für Titan ein bakteriostatischer Effekt nachgewiesen werden [95, 231]. In diesem Zusammenhang ist allerdings zu bemerken, dass anhand von Untersuchungen an Titanoberflächen gezeigt werden konnte, dass auch die Kristallinität eines Metalls die Adhäsion von Mikroorganismen beeinflusst. So besitzt nur kristallines  $\text{TiO}_2$  antibakterielle Eigenschaften, während amorphes  $\text{TiO}_2$

die Adhäsion fördert [186]. Dies deutet darauf hin, dass die Adhäsion von Mikroorganismen weniger im Zusammenhang mit der Werkstoffgruppe (z.B. Kunststoffe) als im Zusammenhang mit den spezifischen Eigenschaften eines bestimmten Materials (z.B. Sinfony) steht.

Dafür spricht auch, dass verschiedene Studien *in vitro* und *in vivo*, die die Adhäsion von Mikroorganismen an Metalle, Keramiken und Kunststoffe anhand unterschiedlicher Vertreter untersuchten, hinsichtlich der Frage, welche Werkstoffgruppe die stärkste bzw. schwächste Kolonisierung aufweist, zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen kamen [29,55,82,94,213,230]. Beispielsweise fanden Tanner *et al.*, die für ihre Untersuchung die Feldspat-Keramik Celay verwendeten, im Vergleich zu verschiedenen Metallen auf Keramik die stärkste Ansammlung von *Streptococcus mutans*-Zellen [230], wohingegen Eick *et al.*, die mit der Glaskeramik Empress arbeiteten auf Keramik vergleichsweise am wenigsten *Streptococcus mutans*-Zellen fanden [55]. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass Rosentritt *et al.* feststellten, dass sich verschiedene Vertreter der gleichen Werkstoffgruppe deutlich in ihrer Neigung zur Akkumulation von Mikroorganismen unterscheiden [195]. Studien von Poggio *et al.*, Hahnel *et al.* und Bürgers *et al.*, die die Adhäsion von *Streptococcus mutans* bzw. *Candida albicans* an verschiedene Kunststoffe bzw. Komposite untersuchten, bestätigen dies [36,84,179]. So zeigen ihre Studien, dass die untersuchten Keime an siloranbasierte Komposite weniger adhärten als an methacrylatbasierte Komposite. Bürgers *et al.* und Poggio *et al.*, die weder eine Korrelation mit der Rauigkeit noch mit der unterschiedlichen freien Oberflächenenergie der Materialien feststellen konnten, führen ihr Ergebnis auf die unterschiedliche spezifische Chemie und Zusammensetzung (Matrix, Füllstoffe) der verschiedenen Materialien zurück [36,179]. Dies verdeutlicht, dass die Adhäsion von Mikroorganismen nicht Werkstoffgruppen-spezifisch erfolgt, aber dennoch von der chemischen Zusammensetzung und dem Aufbau eines Materials bestimmt wird. So sind es im Fall der Komposite bzw. Kunststoffe vor allem Füllkörper und Matrix-Monomere (z.B. TEGDMA, EDMA; vgl. oben), die Einfluss auf die Adhäsion von Mikroorganismen nehmen, deren Anteil bzw. Art sich aber von Material zu Material unterscheidet [128]. Die Bedeutung der Füllkörper wurde von Gröger *et al.* aufgezeigt, die *in vivo* auf allen Urethandimethacrylat(UDMA)-basierten nano-, micro- oder macrogefüllten Kompositen, nicht aber auf einem ungefüllten Kunststoff auf Polymethylmethacrylat-Basis eine Pellikel nachweisen konnten [81]. Da die Pellikel wiederum Einfluss auf die Adhäsion von Mikroorganismen nehmen kann, bestätigen die Ergebnisse von Gröger *et al.* die Bedeutung der Zusammensetzung eines Materials für die Adhäsion von Mikroorganismen.

Insgesamt betrachtet lässt sich festhalten, dass die im Vergleich von Empress, Sinfony und Girobond geringste Adhäsion der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Keime an das keramische Material und die stärkste Adhäsion an das Komposit weder auf die Rauigkeit noch auf die freie Oberflächenenergie der untersuchten Materialien zurückzuführen ist. Stattdessen scheinen an-

dere, in der Chemie der Materialien begründete Faktoren, deren Natur weitere Untersuchungen erfordert, die Adhäsion der untersuchten Keime beeinflusst zu haben. Die Bedeutung der Materialchemie ist allerdings nicht gleichbedeutend mit einem Werkstoffgruppen-abhängigen Muster der Bakterienadhäsion. Das bedeutet, dass aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht geschlussfolgert werden kann, dass Keramiken generell schwach und Kunststoffe generell stark zur Akkumulation von Mikroorganismen neigen, wie es beispielsweise von Skjørland [215] und Svanberg *et al.* [225] postuliert wurde. Eine Bedeutung der (Oberflächen)eigenschaften der untersuchten Keime für ihre unterschiedlich starke Adhäsion an verschiedene Materialien kann hingegen nicht ausgeschlossen werden.

# Kapitel 6

## Zusammenfassung

Das häufige Versagen zahnärztlicher Restaurationen aufgrund von Sekundärkaries und Parodontitis wirft die Frage auf, ob bestimmte Werkstoffe von oralen Keimen bevorzugt kolonisiert werden, welche Materialeigenschaften hierfür verantwortlich sein könnten und welche weiteren Faktoren die Biofilmbildung auf zahnärztlichen Restaurationen beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Adhäsion der oralen Keime *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V an verschiedene prothetische Werkstoffe und der Einfluss der Rauigkeit einer Oberfläche sowie der Anwesenheit einer Speichelpellikel auf die Biofilmbildung *in vitro* untersucht. Ein weiteres Ziel bestand darin, Aussagen über die gegenseitige Beeinflussung der beiden koaggregierenden Keime hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens treffen zu können.

Der Einsatz von *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V für eine Untersuchung zur Biofilmbildung auf zahnärztlichen Restaurationsmaterialien stellte in gewisser Weise ein Novum dar und erforderte eine Untersuchung des Wachstumsverhaltens dieser beiden Keime. Dies erfolgte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit, indem Wachstumskurven aufgestellt und nach dem Ausplattieren normierter Bakterienkulturen eine Zellzahlbestimmung vorgenommen wurde. Dabei wurde sowohl mit Einzelkulturen von *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V als auch mit Kokulturen der beiden Keime gearbeitet. Diese Untersuchungen ergaben zum einen, dass *Streptococcus gordonii* DL1 deutlich früher in die exponentielle Wachstumsphase eintritt als *Actinomyces naeslundii* T14V; weiterhin wurde gezeigt, dass sich beide Keime gegenseitig im Wachstum beeinflussen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde in unterschiedlichen Versuchsreihen die Adhäsion von *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V an unterschiedlich raue (Prothesenkunststoff Palapress mit  $R_a = 0,07 \mu\text{m}$ /  $0,42 \mu\text{m}$ /  $0,65 \mu\text{m}$ ) bzw. aus unterschiedlichen Materialien (Verblendkeramik Empress, Verblendkomposit Sinfony, CoCrMo-Legierung Girobond) gefertigte und hinsichtlich ihrer freien Oberflächenenergie vermessene Prüfkörperoberflächen unter semistatischen Versuchsbedingungen untersucht, wobei ein Drittel der Prüf-

körper mit *Streptococcus gordonii* DL1, ein Drittel mit *Actinomyces naeslundii* T14V und ein Drittel mit beiden Keimen inkubiert wurde. Dadurch war eine Beurteilung der gegenseitigen Beeinflussung beider Keime während des Adhäsionsprozesses möglich. Darüberhinaus wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Einfluss der Inkubationsdauer (2<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, 4, 24 Stunden) auf das Adhäsionsverhalten von *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V und ihre gegenseitige Beeinflussung untersucht. Weiterhin war für alle Versuchsreihen stets die Hälfte der Prüfkörper zunächst mit Speichel inkubiert worden, um so die Bildung einer Speichelpellikel zu imitieren und auch deren Einfluss auf die Adhäsion der untersuchten Keime analysieren zu können.

Die Quantifizierung der (vitalen) adhärenen Zellen erfolgte mit Hilfe des auf fluoreszieren-der Färbung beruhenden Vitalitätsassays CytoX-Violet™ und rasterelektronenmikroskopischer Analyse der Prüfkörperoberflächen.

Die untersuchten Keime adhärten an die unterschiedlichen Restaurationsmaterialien unterschiedlich stark (am geringsten an Empress, am häufigsten an Sinfony), wobei dies nicht im Zusammenhang mit der freien Oberflächenenergie der Materialien stand. Eine Korrelation zwischen der Rauigkeit einer Oberfläche und der Adhäsion von *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Der Einfluss der Pellikel auf die Adhäsion der beiden Keime zeigte sich hingegen deutlich; ihre Anwesenheit führte generell zu einer reduzierten Zahl adhärenen Zellen. Hinsichtlich der gegenseitigen Beeinflussung beider Keime wurde festgestellt, dass der Biofilm bei gemeinsamer Inkubation beider Keime von Streptokokken dominiert war. Darüberhinaus zeigte die Adhäsion von *Streptococcus gordonii* DL1 und *Actinomyces naeslundii* T14V eine gegenläufige Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

# Kapitel 7

## Resümee und Ausblick

Eine geringe Neigung zur Akkumulation von Mikroorganismen bzw. eine gewisse Selbstreinigungsfunktion sind wünschenswerte Eigenschaften eines zahnärztlichen Restaurationsmaterials, um Sekundärkaries und Parodontitis vorzubeugen. Bisher ist bekannt, dass eine geringe Rauigkeit und eine niedrige freie Oberflächenenergie dazu beitragen sollen, dass ein Material derartige protektive Eigenschaften besitzt. Die vorliegende Arbeit konnte dies allerdings nicht bestätigen, was darauf hindeutet, dass es weitere Faktoren gibt, die die Adhäsion von Mikroorganismen an bzw. deren nachfolgende Ablösung von zahnärztlichen Restaurationsmaterialien beeinflussen. Dazu könnten die spezifischen chemischen Eigenschaften (Zusammensetzung, Struktur) und die Oberflächenladung eines Materials zählen, was bislang allerdings wenig untersucht wurde [85]. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, bei künftigen Studien die untersuchten Materialien hinsichtlich weiterer, über die Rauigkeit und die freie Oberflächenenergie hinausgehende Eigenschaften zu charakterisieren.

Weiterhin ist zu beachten, dass es für Untersuchungen *in vitro* eine wesentliche Rolle spielt, mit welchen Keimen gearbeitet wird, denn deren Oberflächeneigenschaften (Ladung, Oberflächenenergie) beeinflussen ebenfalls ihre Adhäsion. In diesem Zusammenhang ist von besonderer Bedeutung, dass in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu den meisten anderen Studien nicht mit *Streptococcus mutans*, sondern mit *Streptococcus gordonii* und *Actinomyces naeslundii* gearbeitet wurde, diese aber anders als *Streptococcus mutans* echte Frühbesiedler darstellen [84,179]. Dadurch lässt die vorliegende Arbeit aussagekräftige und zum Teil auf die Situation *in vivo* übertragbare Ergebnisse bezüglich der initialen Adhäsion oraler Mikroorganismen erwarten. Da diese Phase einen entscheidenden und von vielen Faktoren beeinflussten Schritt der Biofilmbildung auf oralen Oberflächen darstellt, erscheint es vielversprechend, künftige Untersuchungen zur Biofilmbildung auf zahnärztlichen Materialien *in vitro* mit *Streptococcus gordonii* und *Actinomyces naeslundii* durchzuführen. Dabei sollte auch eine Bestimmung ihrer freien Oberflächenenergien und ihrer Oberflächenladung erfolgen, um so weitere Einblicke in den Ad-

häsionsprozess zu erhalten. In künftigen Untersuchungen können zudem die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der gegenseitigen Beeinflussung beider Keime beim Adhäsionsprozess (Streptokokkendominanz bei Ko-Inkubation) erweitert werden. Beispielsweise könnte dabei die Inokulationsreihenfolge beider Keime variiert werden und eine Resuspendierung der Zellen in Speichel anstatt PBS erfolgen, wie es von Palmer *et al.* beschrieben wurde [176]. Sie konnten zeigen, dass sich eine Suspendierung in Speichel förderlich auf die Adhäsion auswirken kann. Da Mikroorganismen auch in der Mundhöhle von Speichel umgeben sind, kann eine Untersuchung *in vitro* durch die Verwendung von Bakteriensuspensionen auf Basis von Speichel zudem der Situation *in vivo* noch besser angenähert werden.

Dass die Anwesenheit von Speichel bzw. einer Speichelpellikel neben den physikochemischen Eigenschaften eines Materials und den Oberflächeneigenschaften der Bakterien ein weiterer wichtiger Einflussfaktor hinsichtlich des Adhäsionsgeschehens ist, konnte die vorliegende Arbeit deutlich zeigen. So konnten bei vorhandener Speichelpellikel signifikant weniger adhärente Zellen auf den Prüfkörperoberflächen festgestellt werden als auf den blanken Substraten. Im Rahmen der Diskussion wurde gezeigt, dass dies auf die reduzierte Adhäsionskraft der Zellen in Anwesenheit einer Speichelpellikel zurückgeführt werden kann. Die Pellikel trägt also in gewissem Maß zur Selbstreinigung einer Oberfläche bei, indem sie das „Detachment“ adhärenter Zellen fördert. Aufgrund ihrer Bedeutung scheint es sinnvoll, auch in zukünftigen Untersuchungen nicht auf die Bildung einer Speichelpellikel zu verzichten und eine profunde Analyse der Pellikeleigenschaften bei der Interpretation der mikrobiellen Adhäsion vorzunehmen.



# Literaturverzeichnis

- [1] 3M ESPE DEUTSCHLAND: *Gebrauchsanweisung Sinfony™*. 2011
- [2] 3M ESPE DEUTSCHLAND: *Produktinformation Sinfony™ Lichthärtendes Kronen- und Brücken-Verblendcomposite*. 2011
- [3] ABSOLOM, D. R. ; LAMBERTI, F. V. ; POLICOVA, Z. ; ZINGG, W. ; VAN OSS, C. J. ; NEUMANN, A. W.: Surface thermodynamics of bacterial adhesion. In: *Applied and Environmental Microbiology* 46 (1983), Nr. 1, S. 90–97
- [4] ADAIR, C. G. ; GORMAN, S. P. ; BYERS, L. B. ; JONES, D. S. ; GARDINER, T. A.: Confocal laser scanning microscopy for examination of microbial biofilms. In: AN, Y. H. (Hrsg.) ; FRIEDMAN, R. J. (Hrsg.): *Handbook of Bacterial Adhesion. Principles, Methods and Applications*. Humana Press, 2000, S. 249–257
- [5] AL-AHMAD, A. ; FOLLO, M. ; SELZER, A.-C. ; HELLWIG, E. ; HANNIG, M. ; HANNIG, C.: Bacterial colonization of enamel *in situ* investigated using fluorescence in situ hybridization. In: *Journal of Medical Microbiology* 58 (2009), Nr. 10, S. 1359–1366
- [6] AL-AHMAD, A. ; WUNDER, A. ; AUSCHILL, T. M. ; FOLLO, M. ; BRAUN, G. ; HELLWIG, E. ; ARWEILER, N. B.: The *in vivo* dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. In: *Journal of Medical Microbiology* 56 (2007), Nr. 5, S. 681–687
- [7] ALBERS, J.: *Kontaminationen in der Mikrostrukturierung*. München u.a. : Hanser, 2005. – ISBN 3446402918
- [8] AMAECHI, B. T. ; HIGHAM, S. M. ; EDGAR, W. M. ; MILOSEVIC, A.: Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. In: *Journal of Dental Research* 78 (1999), Nr. 12, S. 1821–1828
- [9] AMANN GIRRBACH: *Produktinformation Girobond®NB*. 2011

- [10] AN, Y. H. ; FRIEDMAN, R. J.: Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. In: *Journal of Microbiological Methods* 30 (1997), Nr. 2, S. 141–152
- [11] AN, Y. H. ; FRIEDMAN, R. J. ; DRAUGHN, R. A. ; SMITH, E. A. ; NICHOLSON, J. H. ; JOHN, J. F.: Rapid quantification of staphylococci adhered to titanium surfaces using image analyzed epifluorescence microscopy. In: *Journal of Microbiological Methods* 24 (1995), S. 29–40
- [12] BACKHAUS, K.: *Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung*. 11., überarb. Aufl. Berlin : Springer, 2006 (Springer-Lehrbuch Bestellung). – ISBN 3–540–27870–2; 978–3–540–278
- [13] BAIER, R. E.: Surface behaviour of biomaterials: the theta surface for biocompatibility. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17 (2006), Nr. 11, S. 1057–1062
- [14] BALAZS, D. J. ; TRIANDAFILLU, K. ; CHEVOLOT, Y. ; ARONSSON, B. O. ; HARMS, H. ; DESCOUTS, P. ; MATHIEU, H. J.: Surface modification of PVC endotracheal tubes by oxygen glow discharge to reduce bacterial adhesion. In: *Surface and Interface Analysis* 35 (2003), Nr. 3, S. 301–309
- [15] BARNARD, A. M. L. ; SALMOND, G. P. C.: Quorum Sensing: The Complexities of Chemical Communication between Bacteria. In: *Complexus* 2 (2004), Nr. 2, S. 87–101
- [16] BD DIAGNOSTIC SYSTEMS: *Intructions for use – Ready-To-Use bottled media*. 2003
- [17] BENNICK, A.: Salivary proline-rich proteins. In: *Molecular and Cellular Biochemistry* 45 (1982), Nr. 2, S. 83–99
- [18] BERG, J. M. ; TYMOCZKO, J. L. ; STRYER, L.: *Biochemie*. 5. Aufl. Heidelberg, Berlin : Spektrum, Akad. Verl., 2003 (Spektrum-Lehrbuch). – ISBN 3–8274–1303–6; Pp.
- [19] BIK, E. M. ; LONG, C. D. ; ARMITAGE, G. C. ; LOOMER, P. ; EMERSON, J. ; MONGODIN, E. F. ; NELSON, K. E. ; GILL, S. R. ; FRASER-LIGGETT, C. M. ; RELMAN, D. A.: Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. In: *The ISME Journal* 4 (2010), Nr. 8, S. 962–974
- [20] BOLLEN, C. M. ; LAMBRECHTS, P. ; QUIRYNEN, M.: Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. In: *Dental Materials* 13 (1997), Nr. 4, S. 258–269

- [21] BOLLEN, C. M. ; PAPAIOANNO, W. ; VAN ELDERE, J. ; SCHEPERS, E. ; QUIRYNEN, M. ; VAN STEENBERGHE, D.: The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. In: *Clinical Oral Implants Research* 7 (1996), Nr. 3, S. 201–211
- [22] BOS, R. ; VAN DER MEI, H. C. ; BUSSCHER, H. J.: Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. In: *FEMS Microbiology Reviews* 23 (1999), Nr. 2, S. 179–230
- [23] BOULANGE-PETERMANN, L. ; BAROUX, B. ; BELLON-FONTAINE, M.-N.: The influence of metallic surface wettability on bacterial adhesion. In: *Journal of Adhesion Science and Technology* 7 (1993), Nr. 3, S. 221–230
- [24] BOURAUDEL, C. ; FRIES, T. ; DRESCHER, D. ; PLIETSCH, R.: Surface roughness of orthodontic wires via atomic force microscopy, laser specular reflectance, and profilometry. In: *European Journal of Orthodontics* 20 (1998), Nr. 1, S. 79–92
- [25] BRADWAY, S. D. ; BERGEY, E. J. ; SCANNAPIECO, F. A. ; RAMASUBBU, N. ; ZAWACKI, S. ; LEVINE, M. J.: Formation of salivary-mucosal pellicle: the role of transglutaminase. In: *The Biochemical Journal* 284 (1992), Nr. 2, S. 557–564
- [26] BRANT, J. A. ; CHILDRESS, A. E.: Membrane-Colloid Interactions: Comparison of Extended DLVO Predictions with AFM Force Measurements. In: *Environmental Engineering Science* 19 (2002), Nr. 6, S. 413–427
- [27] BUDTZ-JØRGENSEN, E. ; ISIDOR, F.: A 5-year longitudinal study of cantilevered fixed partial dentures compared with removable partial dentures in a geriatric population. In: *The Journal of Prosthetic Dentistry* 64 (1990), Nr. 1, S. 42–47
- [28] BUSSCHER, H. J. ; DOORNBUSCH, G. I. ; VAN DER MEI, H. C.: Adhesion of Mutans Streptococci to Glass with and Without a Salivary Coating as Studied in a Parallel-Plate Flow Chamber. In: *Journal of Dental Research* 71 (1992), S. 491–500
- [29] BUSSCHER, H. J. ; RINASTITI, M. ; SISWOMIHARDJO, W. ; VAN DER MEI, H. C.: Biofilm formation on dental restorative and implant materials. In: *Journal of Dental Research* 89 (2010), Nr. 7, S. 657–665
- [30] BUSSCHER, H. J. ; VAN DE BELT-GRITTER, B. ; DIJKSTRA, R. J. B. ; NORDE, W. ; VAN DER MEI, H. C.: *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius* Adhesion to Fibronectin Films Are Oppositely Influenced by Ionic Strength. In: *Langmuir* 24 (2008), Nr. 19, S. 10968–10973

- [31] BUSSCHER, H. J. ; VAN DER MEI, R. ; BOS, H. C.: Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. In: *FEMS Microbiology Letters* 128 (1995), Nr. 3, S. 229–234
- [32] BUSSCHER, H. J. ; VAN PELT, A. W. J. ; DE BOER, P. ; DE JONG, H. P. ; ARENDS, J.: The effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. In: *Colloids and Surfaces* 9 (1984), Nr. 4, S. 319–331
- [33] BY, Y. ; DURAND-GORDE, J.-M. ; CONDO, J. ; LEJEUNE, P.-J. ; FENOUILLET, E. ; GUIEU, R. ; RUF, J.: Monoclonal antibody-assisted stimulation of adenosine A<sub>2A</sub> receptors induces simultaneous downregulation of CXCR4 and CCR5 on CD4<sup>+</sup> T-cells. In: *Human Immunology* 71 (2010), Nr. 11, S. 1073–1076
- [34] BÜRGERS, R. ; GERLACH, T. ; HAHNEL, S. ; SCHWARZ, F. ; HANDEL, G. ; GOSAU, M.: *In vivo* and *in vitro* biofilm formation on two different titanium implant surfaces. In: *Clinical Oral Implants Research* 21 (2010), Nr. 2, S. 156–164
- [35] BÜRGERS, R. ; HAHNEL, S. ; REICHERT, T. E. ; ROSENTRITT, M. ; BEHR, M. ; GERLACH, T. ; HANDEL, G. ; GOSAU, M.: Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. In: *Acta Biomaterialia* 6 (2010), Nr. 6, S. 2307–2313
- [36] BÜRGERS, R. ; SCHNEIDER-BRACHERT, W. ; ROSENTRITT, M. ; HANDEL, G. ; HAHNEL, S.: *Candida albicans* adhesion to composite resin materials. In: *Clinical Oral Investigations* 13 (2009), Nr. 3, S. 293–299
- [37] CARLÉN, A. ; BÖRJESSON, A. C. ; NIKDEL, K. ; OLSSON, J.: Composition of pellicles formed *in vivo* on tooth surfaces in different parts of the dentition, and *in vitro* on hydroxyapatite. In: *Caries Research* 32 (1998), Nr. 6, S. 447–455
- [38] CHEN, P. ; CISAR, J. O. ; HESS, S. ; HO, J. T. C. ; LEUNG, K. P.: Amended Description of the Genes for Synthesis of *Actinomyces naeslundii* T14V Type 1 Fimbriae and Associated Adhesin. In: *Infection and Immunity* 75 (2007), Nr. 8, S. 4181–4185
- [39] CHIOCCHETTI, A. ; ZHOU, J. ; ZHU, H. ; KARL, T. ; HAUBENREISSER, O. ; RINNERTHALER, M. ; HEEREN, G. ; OENDER, K. ; BAUER, J. ; HINTNER, H.: Ribosomal proteins Rpl10 and Rps6 are potent regulators of yeast replicative life span. In: *Experimental Gerontology* 42 (2007), Nr. 4, S. 275–286

- [40] CHRISTENSEN, G. D. ; SIMPSON, G. A. ; ANGLIN, J. O. ; GAINOR, B. J.: Methods for evaluating attached bacteria and biofilms. In: AN, Y. H. (Hrsg.) ; FRIEDMAN, R. J. (Hrsg.): *Handbook of Bacterial Adhesion. Principles, Methods and Applications*. Humana Press, 2000, S. 213–233
- [41] CHRISTERSSON, C. E. ; DUNFORD, R. G.: Salivary film formation on defined solid surfaces in the absence and presence of microorganisms. In: *Biofouling* 3 (1991), Nr. 3, S. 237–250
- [42] CHRISTERSSON, C. E. ; GLANTZ, P. O. ; BAIER, R. E.: Role of temperature and shear forces on microbial detachment. In: *Scandinavian Journal of Dental Research* 96 (1988), Nr. 2, S. 91–98
- [43] CISAR, J. O. ; KOLENBRANDER, P. E. ; MCINTIRE, F. C.: Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. In: *Infection and Immunity* 24 (1979), Nr. 3, S. 742–752
- [44] CRAIG, R. G. ; POWERS, J. M. ; WATAHA, J. C.: *Zahnärztliche Werkstoffe; Eigenschaften und Verarbeitung*. 1. Aufl. München : Elsevier u.a., 2006. – ISBN 3–437–05126–1; 978–3–437–05126–5
- [45] DAWES, C.: The nature of dental plaque, films, and calcareous deposits. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 153 (1968), Nr. 1, S. 102–119
- [46] DE BACKER, H. ; VAN MAELE, G. ; DE MOOR, N. ; VAN DEN BERGHE, L.: Single-tooth replacement: is a 3-unit fixed partial denture still an option? A 20-year retrospective study. In: *The International Journal of Prosthodontics* 19 (2006), Nr. 6, S. 567–573
- [47] DE BACKER, H. ; VAN MAELE, G. ; DE MOOR, N. ; VAN DEN BERGHE, L.: An up to 20-year retrospective study of 4-unit fixed dental prostheses for the replacement of 2 missing adjacent teeth. In: *The International Journal of Prosthodontics* 21 (2008), Nr. 3, S. 259–266
- [48] DEETJEN, P. ; SPECKMANN, E.-J. ; HESCHELER, J.: *Physiologie*. 4., vollst. überarb. Aufl. München u.a. : Elsevier, Urban & Fischer, 2005. – ISBN 3–437–41317–1; 64.95
- [49] DIGE, I. ; RAARUP, M. K. ; NYENGAARD, J. R. ; KILIAN, M. ; NYVAD, B.: *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. In: *Microbiology* 155 (2009), Nr. 7, S. 2116–2126

- [50] DILLMAN, W. J. ; MILLER, I. F.: On the adsorption of serum proteins on polymer membrane surfaces. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 44 (1973), Nr. 2, S. 221–241
- [51] DING, A. M. ; PALMER, R. J. ; CISAR, J. O. ; KOLENBRANDER, P. E.: Shear-enhanced oral microbial adhesion. In: *Applied and Environmental Microbiology* 76 (2010), Nr. 4, S. 1294–1297
- [52] DO, T. ; HENSSGE, U. ; GILBERT, S. C. ; CLARK, D. ; BEIGHTON, D.: Evidence for recombination between a sialidase (nanH) of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces oris*, previously named *Actinomyces naeslundii* *genospecies 1* and *2*. In: *FEMS Microbiology Letters* 288 (2008), Nr. 2, S. 156–162
- [53] DU, L. D. ; KOLENBRANDER, P. E.: Identification of saliva-regulated genes of *Streptococcus gordonii* *DL1* by differential display using random arbitrarily primed PCR. In: *Infection and Immunity* 68 (2000), Nr. 8, S. 4834–4837
- [54] DUAN, K. ; SIBLEY, C. D. ; DAVIDSON, C. J. ; SURETTE, M. G.: Chemical interactions between organisms in microbial communities. In: *Contributions to Microbiology* 16 (2009), S. 1–17
- [55] EICK, S. ; GLOCKMANN, E. ; BRANDL, B. ; PFISTER, W.: Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. In: *Journal of Oral Rehabilitation* 31 (2004), Nr. 3, S. 278–285
- [56] ELIADES, T. ; ELIADES, G. ; BRANTLEY, W. A.: Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on bracket materials. In: *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 108 (1995), Nr. 4, S. 351–360
- [57] ELIASSON, A. ; ARNELUND, C.-F. ; JOHANSSON, A.: A clinical evaluation of cobalt-chromium metal-ceramic fixed partial dentures and crowns: A three- to seven-year retrospective study. In: *The Journal of Prosthetic Dentistry* 98 (2007), Nr. 1, S. 6–16
- [58] ELLEN, R. P.: Establishment and distribution of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* in the human oral cavity. In: *Infection and Immunity* 14 (1976), Nr. 5, S. 1119–1124
- [59] ENGEL, D.: *Einführung zum Rasterelektronen-Mikroskop*. 2004. – Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Physik

- [60] EPIGENTEK GROUP INC: *User Guide – CytoX-Violet™ Cell Proliferation/Cytotoxicity Assay Kit*
- [61] ERNST, C.-P.: Update Komposite - Teil 1 - Eine Einteilung der Kompositmaterialien. In: *ZMK* 26 (2010), Nr. 4, S. 198–207
- [62] FAHRMEIR, L. ; BRACHINGER, W.: *Multivariate statistische Verfahren*. 2., überarb. Aufl. Berlin ; New York : de Gruyter, 1996. – ISBN 3–11–013806–9
- [63] FASSEL, T. A. ; EDMISTON, C. E.: Evaluating adherent bacteria and biofilm using electron microscopy. In: AN, Y. H. (Hrsg.) ; FRIEDMAN, R. J. (Hrsg.): *Handbook of Bacterial Adhesion. Principles, Methods and Applications*. Humana Press, 2000, S. 235–248
- [64] FEDERLE, M. J.: Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling. In: *Contributions to Microbiology* 16 (2009), S. 18–32
- [65] FIRTEL, M. ; FILLERY, E. D.: Distribution of antigenic determinants between *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. In: *Journal of Dental Research* 67 (1988), Nr. 1, S. 15–20
- [66] FOLWACZNY, M. ; HICKEL, R.: Biofilm - Problem oder Perspektive? In: *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 58 (2003), Nr. 12, S. 648–659
- [67] FOROUZBAKHS, F. ; REZANEJAD GATABI, J. ; REZANEJAD GATABI, I.: A new measurement method for ultrasonic surface roughness measurements. In: *Measurement* 42 (2009), Nr. 5, S. 702–705
- [68] FOSTER, J. S. ; KOLENBRANDER, P. E.: Development of a Multispecies Oral Bacterial Community in a Saliva-Conditioned Flow Cell. In: *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004), Nr. 7, S. 4340–4348
- [69] FRANK, R. M. ; BRENDEN, A.: Ultrastructure of the approximal dental plaque and the underlying normal and carious enamel. In: *Archives of Oral Biology* 11 (1966), Nr. 9, S. 883–912
- [70] FUX, C. A. ; STOODLEY, P. ; HALL-STOODLEY, L. ; COSTERTON, J. W.: Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. In: *Expert Review of Antiinfective Therapy* 1 (2003), Nr. 4, S. 667–683
- [71] GEHRE, G.: Keramische Werkstoffe. In: EICHNER, K. (Hrsg.) ; F., Kappert H. (Hrsg.): *Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung*. Thieme-Verlag Stuttgart New York, 2000, S. 326–372

- [72] GEIS-GERSTORFER, J.: Nichtedelmetalllegierungen. In: EICHNER, K. (Hrsg.) ; KAPPERT, H. F. (Hrsg.): *Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung*. Thieme-Verlag Stuttgart New York, 2000, S. 119–172
- [73] GEMEINSAMER BUNDESAUSSCHUSS GEM. § 91 ABS. 6 SGB V IN DER BESETZUNG FÜR DIE VERTRAGSZAHNÄRZTLICHE VERSORGUNG ZUR BESTIMMUNG DER BEFUNDE UND DER REGELVERSORGUNGSLEISTUNGEN: *Festzuschuss-Richtlinie*. 2010
- [74] GERATH, F.: *Quantitative Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von Speichelkomponenten in der Pellicel des Prothesenbasiskunststoffes PMMA*, Universität Rostock: Medizinische Fakultät, Diss., 2008
- [75] GIBBONS, R. J. ; COHEN, L. ; HAY, D. I.: Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. In: *Infection and Immunity* 52 (1986), Nr. 2, S. 555–561
- [76] GIBBONS, R. J. ; ETHERDEN, I. ; MORENO, E. C.: Association of neuraminidase-sensitive receptors and putative hydrophobic interactions with high-affinity binding sites for *Streptococcus sanguis* C5 in salivary pellicles. In: *Infection and Immunity* 42 (1983), Nr. 3, S. 1006–1012
- [77] GIBBONS, R. J. ; HAY, D. I.: Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces. In: *Journal of Dental Research* 68 (1989), Nr. 9, S. 1303–1307
- [78] GIBBONS, R. J. ; HOUTE, J. V.: Bacterial adherence in oral microbial ecology. In: *Annual Review of Microbiology* 29 (1975), S. 19–44
- [79] GILLIES, R. ; DIDIER, N. ; DENTON, M.: Determination of cell number in monolayer cultures. In: *Analytical Biochemistry* 159 (1986), Nr. 1, S. 109–113
- [80] GOLDBERG, S. ; KONIS, Y. ; ROSENBERG, M.: Effect of cetylpyridinium chloride on microbial adhesion to hexadecane and polystyrene. In: *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1990), Nr. 6, S. 1678–1682
- [81] GRÖGER, G. ; ROSENTRITT, M. ; BEHR, M. ; SCHRÖDER, J. ; HANDEL, G.: Dental resin materials *in vivo* – TEM results after one year: a pilot study. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17 (2006), Nr. 9, S. 825–828



- [82] HAHN, R. ; WEIGER, R. ; NETUSCHIL, L. ; BRÜCH, M.: Microbial accumulation and vitality on different restorative materials. In: *Dental Materials* 9 (1993), Nr. 5, S. 312–316
- [83] HAHNEL, S.: *Die Eignung von Proteinmischungen als Speichelersatz für die bakterielle in vitro Adhäsion*, Universität Regensburg: Medizinische Fakultät - Zahnmedizin, Diss., 2007
- [84] HAHNEL, S. ; HENRICH, A. ; ROSENTRITT, M. ; HANDEL, G. ; BÜRGERS, R.: Influence of artificial ageing on surface properties and *Streptococcus mutans* adhesion to dental composite materials. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (2010), Nr. 2, S. 823–833
- [85] HAHNEL, S. ; ROSENTRITT, M. ; BÜRGERS, R. ; HANDEL, G.: Surface properties and *in vitro Streptococcus mutans* adhesion to dental resin polymers. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (2008), Nr. 7, S. 2619–2627
- [86] HAHNEL, S. ; ROSENTRITT, M. ; HANDEL, G. ; BÜRGERS, R.: Influence of saliva substitute films on initial *Streptococcus mutans* adhesion to enamel and dental substrata. In: *Journal of Dentistry* 36 (2008), Nr. 12, S. 977–983
- [87] HAHNEL, S. ; ROSENTRITT, M. ; HANDEL, G. ; BÜRGERS, R.: Surface characterization of dental ceramics and initial streptococcal adhesion *in vitro*. In: *Dental Materials* 25 (2009), Nr. 8, S. 969–975
- [88] HAHNEL, S. ; ROSENTRITT, M. ; HANDEL, G. ; BÜRGERS, R.: *In vitro* evaluation of artificial ageing on surface properties and early *Candida albicans* adhesion to prosthetic resins. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20 (2009), Nr. 1, S. 249–255
- [89] HALLBERG, K. ; HOLM, C. ; ÖHMAN, U. ; STRÖMBERG, N.: *Actinomyces naeslundii* Displays Variant fimP and fimA Fimbrial Subunit Genes Corresponding to Different Types of Acidic Proline-Rich Protein and  $\beta$ -Linked Galactosamine Binding Specificity. In: *Infection and Immunity* 66 (1998), Nr. 9, S. 4403–4410
- [90] HANNIG, C. ; FOLLO, M. ; HELLWIG, E. ; AL-AHMAD, A.: Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. In: *Journal of Medical Microbiology* 59 (2010), Nr. 1, S. 1–7

- [91] HANNIG, C. ; HANNIG, M.: The oral cavity – a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. In: *Clinical Oral Investigations* 13 (2009), Nr. 2, S. 123–139
- [92] HANNIG, C. ; HANNIG, M. ; ATTIN, T.: Enzymes in the acquired enamel pellicle. In: *European Journal of Oral Sciences* 113 (2005), Nr. 1, S. 2–13
- [93] HANNIG, C. ; HANNIG, M. ; REHMER, O. ; BRAUN, G. ; HELLWIG, E. ; AL-AHMAD, A.: Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel *in situ*. In: *Archives of Oral Biology* 52 (2007), Nr. 11, S. 1048–1056
- [94] HANNIG, M.: *Elektronenmikroskopische Untersuchungen der initialen Bioadhäsionsprozesse an Festkörperoberflächen in der Mundhöhle*. 1. Aufl. Berlin : Quintessenz Verlags-GmbH, 1998. – ISBN 9783876529929
- [95] HANNIG, M. ; HANNIG, C.: Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? In: *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 29 (2007), Nr. 2, S. 73–82
- [96] HANNIG, M. ; HESS, N. J. ; HOTH-HANNIG, W. ; DE VRESE, M.: Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization – an *in situ* pilot study. In: *Clinical Oral Investigations* 7 (2003), Nr. 3, S. 158–161
- [97] HANNIG, M. ; KRIENER, L. ; HOTH-HANNIG, W. ; BECKER-WILLINGER, C. ; SCHMIDT, H.: Influence of nanocomposite surface coating on biofilm formation *in situ*. In: *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7 (2007), Nr. 12, S. 4642–4648
- [98] HARA, A. T. ; LUSSI, A. ; ZERO, D. T.: Biological factors. In: *Monographs in Oral Science* 20 (2006), S. 88–99
- [99] HEIDEMANN, D. ; BECKER, J.: *Kariologie und Füllungstherapie*. 4. Aufl. München, Wien, Baltimore : Urban und Schwarzenberg, 1999 (Praxis der Zahnheilkunde, Teil Bd. 2). – ISBN 3-541-15222-2
- [100] HELLWIG, E. ; KLIMEK, J. ; ATTIN, T.: *Einführung in die Zahnerhaltung*. 4., neu bearb. Aufl. München : Elsevier, Urban & Fischer, 2007. – ISBN 3437055801; 9783437055805
- [101] HENSSGE, U. ; DO, T. ; RADFORD, D. R. ; GILBERT, S. C. ; CLARK, D. ; BEIGHTON, D.: Emended description of *Actinomyces naeslundii* and descriptions of *Actinomyces oris* sp. nov. and *Actinomyces johnsonii* sp. nov., previously identified as *Actinomyces naeslundii* *genospecies* 1, 2 and WVA 963. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (2009), Nr. 3, S. 509–516

- [102] HERAEUS KULZER: *Gebrauchsinformation Palapress® vario*. 2003
- [103] HERAEUS KULZER: *Produktinformation Palapress® vario*. 2011
- [104] HERLES, S. ; OLSEN, S. ; AFFLITTO, J. ; GAFFAR, A.: Chemostat flow cell system: an *in vitro* model for the evaluation of antiplaque agents. In: *Journal of Dental Research* 73 (1994), Nr. 11, S. 1748–1755
- [105] HICKMAN, C. P. ; LAZAR, T. ; WEBER, W.-M.: *Zoologie*. 13., aktualisierte Aufl. der engl. Ausg. München : Pearson Education, 2008 (Pearson Studium bio biologie). – ISBN 9783827372659
- [106] HODGSON, R. J. ; LYNCH, R. J. ; WATSON, G. K. ; LABARBE, R. ; TRELOAR, R. ; ALLISON, C.: A continuous culture biofilm model of cariogenic responses. In: *Journal of Applied Microbiology* 90 (2001), Nr. 3, S. 440–448
- [107] HOEK, E. M. V. ; AGARWAL, G. K.: Extended DLVO interactions between spherical particles and rough surfaces. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 298 (2006), Nr. 1, S. 50–58
- [108] HOFLACK, L. ; YEUNG, M. K.: *Actinomyces naeslundii* fimbrial protein Orf977 shows similarity to a streptococcal adhesin. In: *Oral Microbiology and Immunology* 16 (2001), Nr. 5, S. 319–320
- [109] HOGT, A. H. ; DANKERT, J. ; FEIJEN, J.: Adhesion of coagulase-negative staphylococci to methacrylate polymers and copolymers. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 20 (1986), Nr. 4, S. 533–545
- [110] HÖLAND, W. ; FRANK, M.: Werkstoffwissenschaftliche Betrachtungen zur Empress-Glaskeramik. In: *Report*. Ivoclar Vivadent AG, 1994 (10), S. 3–8
- [111] I + G GESUNDHEITSFORSCHUNG MÜNCHEN: Bedarfsermittlung für prothetische Leistungen in der Zahnheilkunde bis zum Jahr 2020 / Deutsche Gesellschaft für Zahnärztliche Prothetik und Werkstoffkunde. 2001. – Forschungsbericht
- [112] INSTITUT DER DEUTSCHEN ZAHNÄRZTE (IDZ): Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV) / Bundeszahnärztekammer und Kassenzahnärztlicher Bundesvereinigung. 2006. – Forschungsbericht
- [113] JAKSTAT, H. A. ; HÄSSLER, C. ; KROSZEWSKY, K.: *Zahnärztliche Werkstoffkunde. Ein Arbeitsbuch*. Norderstedt : Books on Demand GmbH, 2006. – ISBN 3–8334–4260–3; kart.

- [114] JAKUBOVICS, N. S. ; GILL, S. R. ; IOBST, S. E. ; VICKERMAN, M. M. ; KOLENBRANDER, P. E.: Regulation of gene expression in a mixed-genus community: stabilized arginine biosynthesis in *Streptococcus gordonii* by coaggregation with *Actinomyces naeslundii*. In: *Journal of Bacteriology* 190 (2008), Nr. 10, S. 3646–3657
- [115] JAKUBOVICS, N. S. ; GILL, S. R. ; VICKERMAN, M. M. ; KOLENBRANDER, P. E.: Role of hydrogen peroxide in competition and cooperation between *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces naeslundii*. In: *FEMS Microbiology Ecology* 66 (2008), Nr. 3, S. 637–644
- [116] JANDA, R.: Chemie und Physik zahnärztlicher Kunststoffe. In: EICHNER, K. (Hrsg.) ; F., Kappert H. (Hrsg.): *Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung*. Thieme-Verlag Stuttgart New York, 2000, S. 173–210
- [117] JANSSEN, J. ; LAATZ, W.: *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows*. 6., neu bearb. und erw. Aufl. Berlin u.a. : Springer, 2007. – ISBN 978–3–540–72977–8
- [118] JENKINSON, H. F.: Cell surface protein receptors in oral streptococci. In: *FEMS Microbiology Letters* 121 (1994), Nr. 2, S. 133–140
- [119] JONES, G. W. ; ISAACSON, R. E.: Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. In: *Critical Reviews of Microbiology* 10 (1983), Nr. 3, S. 229–260
- [120] JUNG, D. J. ; AL-AHMAD, A. ; FOLLO, M. ; SPITZMÜLLER, B. ; HOTH-HANNIG, W. ; HANNIG, M. ; HANNIG, C.: Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel *in situ*. In: *Journal of Microbiological Methods* 81 (2010), Nr. 2, S. 166–174
- [121] JURIAANSE, A. C. ; BOOIJ, M. ; ARENDS, J. ; TEN BOSCH, J. J.: The adsorption *in vitro* of purified salivary proteins on bovine dental enamel. In: *Archives of Oral Biology* 26 (1981), Nr. 2, S. 91–96
- [122] KARATAN, E. ; WATNICK, P.: Signals, Regulatory Networks and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews MMBR* 73 (2009), Nr. 2, S. 310–347
- [123] KASSENZAHNÄRZTLICHE BUNDESVEREINIGUNG (Hrsg.): *Statistisches Jahrbuch 2010*. 2010
- [124] KATSIKOIANNI, M. ; MISSIRLIS, Y. F.: Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. In: *European Cells Materials* 8 (2004), S. 37–57

- [125] KAUTEK, W. ; RUDOLPH, P. ; DAMINELLI, G. ; KRÜGER, J.: Physico-chemical aspects of femtosecond-pulse-laser-induced surface nanostructures. In: *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 81 (2005), Nr. 1, S. 65–70
- [126] KAWAI, K. ; URANO, M.: Adherence of plaque components to different restorative materials. In: *Operative Dentistry* 26 (2001), Nr. 4, S. 396–400
- [127] KAWAI, K. ; URANO, M. ; EBISU, S.: Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. In: *The Journal of Prosthetic Dentistry* 83 (2000), Nr. 6, S. 664–667
- [128] KHALICHI, P. ; CVITKOVITCH, D. G. ; SANTERRE, J. P.: Effect of composite resin biodegradation products on oral streptococcal growth. In: *Biomaterials* 25 (2004), Nr. 24, S. 5467–5472
- [129] KILIÇ, A. O. ; TAO, L. ; ZHANG, Y. ; LEI, Y. ; KHAMMANIVONG, A. ; HERZBERG, M. C.: Involvement of *Streptococcus gordonii* beta-glucoside metabolism systems in adhesion, biofilm formation, and *in vivo* gene expression. In: *Journal of Bacteriology* 186 (2004), Nr. 13, S. 4246–4253
- [130] KLUTHE, V.: *Vergleich der Bruchfestigkeit von IPS Empress 2-Kronen mit natürlichen Zähnen*, Freie Universität Berlin: Fachbereich Humanmedizin, Diss., 2003
- [131] KOECK, B. ; BEHNEKE, A. ; HAUNFELDER, D.: *Kronen- und Brückenprothetik*. 4. Aufl. München u.a. : Urban & Fischer, 1999 (Praxis der Zahnheilkunde, Teil Bd. 5). – ISBN 3541152524
- [132] KOLENBRANDER, P. E.: Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. In: *Annual Review of Microbiology* 54 (2000), S. 413–437
- [133] KOLENBRANDER, P. E. ; LONDON, J.: MINIREVIEW Adhere Today, Here Tomorrow: Oral Bacterial Adherence. In: *Journal of Bacteriology* 175 (1993), Nr. 11, S. 3247–3252
- [134] KOLENBRANDER, P. E. ; PALMER, R. J. ; PERIASAMY, S. ; JAKUBOVICS, N. S.: Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. In: *Nature Reviews Microbiology* 8 (2010), Nr. 7, S. 471–480
- [135] KOUSVELARI, E. E. ; BARATZ, R. S. ; BURKE, B. ; OPPENHEIM, F. G.: Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle and glandular tissue specimens. In: *Journal of Dental Research* 59 (1980), Nr. 8, S. 1430–1438

- [136] KUBONIWA, M. ; TRIBBLE, G. D. ; JAMES, C. E. ; KILIÇ, A. O. ; TAO, L. ; HERZBERG, M. C. ; SHIZUKUISHI, S. ; LAMONT, R. J.: *Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community. In: *Molecular Microbiology* 60 (2006), Nr. 1, S. 121–139
- [137] LAGALY, G. ; SCHULZ, O. ; ZIMEHL, R.: *Dispersionen und Emulsionen. Eine Einführung in die Kolloidik feinverteilter Stoffe einschließlich der Tonminerale*. Darmstadt : Steinkopff, 1997. – ISBN 3–7985–1087–3
- [138] LAMONT, R. J. ; ROSAN, B.: Adherence of mutans streptococci to other oral bacteria. In: *Infection and Immunity* 58 (1990), Nr. 6, S. 1738–1743
- [139] LEE, B. C. ; JUNG, G. Y. ; KIM, D. J. ; HAN, J. S.: Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia *in vitro*. In: *The Journal of Advanced Prosthodontics* 3 (2011), Nr. 2, S. 81–84
- [140] LEE, S.-P. ; LEE, S.-J. ; LIM, B.-S. ; AHN, S.-J.: Surface characteristics of orthodontic materials and their effects on adhesion of mutans streptococci. In: *The Angle Orthodontist* 79 (2009), Nr. 2, S. 353–360
- [141] LENDENMANN, U. ; GROGAN, J. ; OPPENHEIM, F. G.: Saliva and dental pellicle – a review. In: *Advances in Dental Research* 14 (2000), Nr. 1, S. 22–28
- [142] LEYER, A.: *Untersuchung der bakteriellen Adhäsion an dentale Adhäsivsysteme*, Universität Regensburg: Medizinische Fakultät - Zahnmedizin, Diss., 2010
- [143] LI, J. ; HELMERHORST, E. J. ; LEONE, C. W. ; TROXLER, R. F. ; YASKELL, T. ; HAF-FAJEE, A. D. ; SOCRANSKY, S. S. ; OPPENHEIM, F. G.: Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. In: *Journal of Applied Microbiology* 97 (2004), Nr. 6, S. 1311–1318
- [144] LILJEMARK, W. F. ; SCHAUER, S. V.: Competitive binding among oral streptococci to hydroxyapatite. In: *Journal of Dental Research* 56 (1977), Nr. 2, S. 157–165
- [145] LIU, D.: *Molecular detection of human bacterial pathogens*. Boca Raton, Fla. u.a. : CRC Press, 2011. – ISBN 978–1–4398–1238–9; 1–4398–1238–1
- [146] MABBOUX, F. ; PONSONNET, L. ; MORRIER, J.-J. ; JAFFREZIC, N. ; BARSOTTI, O.: Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials – an *in vitro* study. In: *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* 39 (2004), Nr. 4, S. 199–205

- [147] MAHADIK, D. B. ; VENKATESWARA RAO, A. ; PARALE, V. G. ; KAVALE, M. S. ; WAGH, P. B. ; INGALE, S. V. ; GUPTA, S. C.: Effect of surface composition and roughness on the apparent surface free energy of silica aerogel materials. In: *Applied Physics Letters* 99 (2011), Nr. 10, S. 104104, 3 pages
- [148] MAHR GMBH: *Perthometer, Oberflächenkenngrößen*. 1999
- [149] MAIER, R. M. ; PEPPER, I. L. ; GERBA, C. P.: *Environmental microbiology*. 2. ed. Amsterdam u.a. : Elsevier Acad. Press, 2009. – ISBN 978-0-12-370519-8
- [150] MAMPEL, J. ; SPIRIG, T. ; WEBER, S. S. ; HAAGENSEN, J. A. J. ; MOLIN, S. ; HILBI, H.: Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. In: *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2006), Nr. 4, S. 2885–2895
- [151] MARSH, P. ; MARTIN, M. V.: *Orale Mikrobiologie*. Stuttgart u.a. : Thieme, 2003. – ISBN 313129731X
- [152] MARTIENSSEN, M.: *Leistungen immobilisierter Mikroorganismen bei der Eliminierung von Umweltschadstoffen*, Martin-Luther-Universität Halle - Wittenberg: Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Diss., 2001
- [153] MARXKORS, R. ; MEINERS, H. ; GEIS-GERSTORFER, J.: *Taschenbuch der zahnärztlichen Werkstoffkunde. Vom Defekt zur Restauration*. 6., überarb. Aufl.. Köln : Dt. Zahnärzte-Verl., 2008. – ISBN 978-3-7691-3344-8
- [154] MCNAB, R. ; HOLMES, A. R. ; CLARKE, J. M. ; TANNOCK, G. W. ; JENKINSON, H. F.: Cell surface polypeptide CshA mediates binding of *Streptococcus gordonii* to other oral bacteria and to immobilized fibronectin. In: *Infection and Immunity* 64 (1996), Nr. 10, S. 4204–4210
- [155] MEI, L. ; BUSSCHER, H. J. ; VAN DER MEI, H. C. ; CHEN, Y. ; DE VRIES, J. ; REN, Y.: Oral bacterial adhesion forces to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-enamel junction in orthodontic treatment. In: *European Journal of Oral Sciences* 117 (2009), Nr. 4, S. 419–426
- [156] MEI, L. ; BUSSCHER, H. J. ; VAN DER MEI, H. C. ; REN, Y.: Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins. In: *Dental Materials* 27 (2011), Nr. 8, S. 770–778

- [157] MEI, L. ; REN, Y. ; BUSSCHER, H. J. ; CHEN, Y. ; VAN DER MEI, H. C.: Poisson analysis of streptococcal bond-strengthening on saliva-coated enamel. In: *Journal of Dental Research* 88 (2009), Nr. 9, S. 841–845
- [158] MILLEDING, P. ; CARLÉN, A. ; WENNERBERG, A. ; KARLSSON, S.: Protein characterisation of salivary and plasma biofilms formed *in vitro* on non-corroded and corroded dental ceramic materials. In: *Biomaterials* 22 (2001), Nr. 18, S. 2545–2555
- [159] MOHAMMAD, S. F. ; ARDEHALI, R.: Quantitation of bacterial adhesion to biomaterials using radiolabeling techniques. In: AN, Y. H. (Hrsg.) ; FRIEDMAN, R. J. (Hrsg.): *Handbook of Bacterial Adhesion. Principles, Methods and Applications*. Humana Press, 2000, S. 259–272
- [160] MONTANARO, L. ; CAMPOCCIA, D. ; RIZZI, S. ; DONATI, M. E. ; BRESCHI, L. ; PRATI, C. ; ARCIOLA, C. R.: Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. In: *Biomaterials* 25 (2004), Nr. 18, S. 4457–4463
- [161] MORGAN, T. D. ; WILSON, M.: The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. In: *Journal of Applied Microbiology* 91 (2001), Nr. 1, S. 47–53
- [162] MOSZNER, N.: Chemie der Monomer- bzw. Polymermatrix von dentalen Füllungskompositen. In: *Report*. Ivoclar Vivadent AG, 2007 (18), S. 8–17
- [163] MÜHLFRIEDEL, B.: *Etablierung eines Fließkammersystems zur bakteriellen Adhäsion in vitro*, Universität Regensburg, Medizinische Fakultät - Zahnmedizin, Diss., 2009
- [164] MÜLLER, R. ; GRÖGER, G. ; HILLER, K.-A. ; SCHMALZ, G. ; RUHL, S.: Fluorescence-Based Bacterial Overlay Method for Simultaneous *In Situ* Quantification of Surface-Attached Bacteria. In: *Applied and Environmental Microbiology* 73 (2007), Nr. 8, S. 2653–2660
- [165] MÜLLER, R. ; THALMAIER, U. ; SCHMALZ, G. ; RUHL, S.: Bacterial adhesion to surfaces of defined polarity in relation to previous protein adsorption. In: *European Cells and Materials* 7, Suppl.1 (2004), S. 69
- [166] NOBBS, A. H. ; JENKINSON, H. F. ; JAKUBOVICS, N. S.: Stick to Your Gums: Mechanisms of Oral Microbial Adherence. In: *Journal of Dental Research* 90 (2011), Nr. 11, S. 1271–1278



- [167] NYAMAA, I.: *Untersuchungen zur In situ-Plaquesanlagerung an Füllungswerkstoffen*, Ludwig-Maximilians-Universität München: Medizinische Fakultät, Diss., 2005
- [168] NYVAD, B. ; KILIAN, M.: Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. In: *Scandinavian Journal of Dental Research* 95 (1987), Nr. 5, S. 369–380
- [169] NYVAD, B. ; KILIAN, M.: Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. In: *Caries Research* 24 (1990), Nr. 4, S. 267–272
- [170] ØRSTAVIK, D. ; KRAUS, F. W.: The acquired pellicle: enzyme and antibody activities. In: *Scandinavian Journal of Dental Research* 82 (1974), Nr. 3, S. 202–205
- [171] ØRSTAVIK, D. ; KRAUS, F. W. ; HENSHAW, L. C.: *In Vitro* Attachment of Streptococci to the Tooth Surface. In: *Infection and Immunity* 9 (1974), Nr. 5, S. 794–800
- [172] OSTE, R. ; RÖNSTRÖM, A. ; BIRKHED, D. ; EDWARDSSON, S. ; STENBERG, M.: Gas-liquid chromatographic analysis of amino acids in pellicle formed on tooth surface and plastic film *in vivo*. In: *Archives of Oral Biology* 26 (1981), Nr. 8, S. 635–641
- [173] OWENS, D. K. ; WENDT, R. C.: Estimation of the surface free energy of polymers. In: *Journal of Applied Polymer Science* 13 (1969), Nr. 8, S. 1741–1747
- [174] O'BRIEN, J. ; WILSON, I. ; ORTON, T. ; POGNAN, F.: Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. In: *The Federation of European Biochemical Societies Journal* 267 (2000), Nr. 17, S. 5421–5426
- [175] O'TOOLE, G. A. ; KOLTER, R.: Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. In: *Molecular Microbiology* 30 (1998), Nr. 2, S. 295–304
- [176] PALMER, R. J. ; KAZMERZAK, K. ; HANSEN, M. C. ; KOLENBRANDER, P. E.: Mutualism versus Independence: Strategies of Mixed-Species Oral Biofilms *In Vitro* Using Saliva as the Sole Nutrient Source. In: *Infection and Immunity* 69 (2001), Nr. 9, S. 5794–5804
- [177] PALMER R. J., Robert J. ; GORDON, S. M. ; CISAR, J. O. ; KOLENBRANDER, P. E.: Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. In: *Journal of Bacteriology* 185 (2003), Nr. 11, S. 3400–3409

- [178] PEETERS, E. ; NELIS, H. J. ; COENYE, T.: Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. In: *Journal of Microbiological Methods* 72 (2008), Nr. 2, S. 157–165
- [179] POGGIO, C. ; ARCIOLA, C. R. ; ROSTI, F. ; SCRIBANTE, A. ; SAINO, E. ; VISAI, L.: Adhesion of *Streptococcus mutans* to different restorative materials. In: *The International Journal of Artificial Organs* 32 (2009), Nr. 9, S. 671–677
- [180] POSPIECH, P.: *Keramik – Vollkeramik; Ein Kompendium für die keramikgerechte Anwendung vollkeramischer Systeme in der Zahnmedizin*. 1999
- [181] POSPIECH, P.: *Die prophylaktisch orientierte Versorgung mit Teilprothesen*. 1. Aufl. Stuttgart u.a. : Thieme, 2002. – ISBN 3–13–126941–3
- [182] PRATT-TERPSTRA, I. H. ; WEERKAMP, A. H. ; BUSSCHER, H. J.: Adhesion of oral streptococci from a flowing suspension to uncoated and albumin-coated surfaces. In: *Journal of General Microbiology* 133 (1987), Nr. 11, S. 3199–3206
- [183] PRATT-TERPSTRA, I. H. ; WEERKAMP, A. H. ; BUSSCHER, H. J.: The effects of pellicle formation on streptococcal adhesion to human enamel and artificial substrata with various surface free-energies. In: *Journal of Dental Research* 68 (1989), Nr. 3, S. 463–467
- [184] PRUITT, K. M. ; CALDWELL, R. C. ; JAMIESON, A. D. ; TAYLOR, R. E.: The Interaction of Salivary Proteins with Tooth Surface. In: *Journal of Dental Research* 48 (1969), Nr. 5, S. 818–823
- [185] PSOCH, A.: *Prothesenakzeptanz teilbezahnter Patienten in Abhängigkeit verschiedener Konstruktionsmerkmale*, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Diss., 2002
- [186] PUCKETT, S. D. ; TAYLOR, E. ; RAIMONDO, T. ; WEBSTER, T. J.: The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. In: *Biomaterials* 31 (2010), Nr. 4, S. 706–713
- [187] QUIRYNEN, M.: The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of *in vitro* and *in vivo* experiments. In: *Journal of Dentistry* 22, Suppl. 1 (1994), S. 13–16

- [188] QUIRYNEN, M. ; BOLLEN, C. M.: The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. In: *Journal of Clinical Periodontology* 22 (1995), Nr. 1, S. 1–14
- [189] REIMER, L.: *Scanning electron microscopy. Physics of image formation and microanalysis*. 2., completely rev. and updated ed. Berlin u.a. : Springer, 1998 (Springer series in optical sciences, Teil 45). – ISBN 3540639764
- [190] REITEMEIER, B. ; SCHWENZER, N. ; EHRENFELD, M. ; BIFFAR, R.: *Einführung in die Zahnmedizin*. Stuttgart u.a. : Thieme, 2006 (Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde). – ISBN 313139191X; 9783131391919
- [191] REYNOLDS, E. C. ; WONG, A.: Effect of adsorbed protein on hydroxyapatite zeta potential and *Streptococcus mutans* adherence. In: *Infection and Immunity* 39 (1983), Nr. 3, S. 1285–1290
- [192] ROCHE INNOVATIS AG: *CASY<sup>®</sup> Cell Counter + Analyser System, Model TT, Operator Manual*. 2002
- [193] ROEHM, N. W. ; RODGERS, G. H. ; HATFIELD, S. M. ; GLASEBROOK, A. L.: An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. In: *Journal of Immunological Methods* 142 (1991), Nr. 2, S. 257–265
- [194] ROSENTRITT, M. ; BEHR, M. ; BÜRGERS, R. ; FEILZER, A. J. ; HAHNEL, S.: *In vitro* adherence of oral streptococci to zirconia core and veneering glass-ceramics. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* 91 (2009), Nr. 1, S. 257–263
- [195] ROSENTRITT, M. ; HAHNEL, S. ; GRÖGER, G. ; MÜHLFRIEDEL, B. ; BÜRGERS, R. ; HANDEL, G.: Adhesion of *Streptococcus mutans* to various dental materials in a laminar flow chamber system. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* 86 (2008), Nr. 1, S. 36–44
- [196] ROSNER, M. ; HOFER, K. ; KUBISTA, M. ; HENGSTSCHLÄGER, M.: Cell size regulation by the human TSC tumor suppressor proteins depends on PI3K and FKBP38. In: *Oncogene* 22 (2003), Nr. 31, S. 4786–4798
- [197] RUHL, S. ; BERLENBACH, P. ; LANGENFELDER, S. ; HÖRL, D. ; LEHN, N. ; HILLER, K.-A. ; SCHMALZ, G. ; DURCHSCHLAG, H.: Integrity of proteins in human saliva after sterilization by gamma irradiation. In: *Applied and Environmental Microbiology* 77 (2011), Nr. 3, S. 749–755

- [198] RUHL, S. ; SANDBERG, A. L. ; CISAR, J. O.: Salivary receptors for the proline-rich protein-binding and lectin-like adhesins of oral actinomyces and streptococci. In: *Journal of Dental Research* 83 (2004), Nr. 6, S. 505–510
- [199] RUMPF, A. K.: *Effekte elektrischer Polarisierung leitender Oberflächen auf die bakterielle Primäradhäsion und Biofilmentwicklung*, Universität Duisburg-Essen, Fachbereich Chemie, Diss., 2009
- [200] RYKKE, M. ; SÖNJU, T.: Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected *in vivo* after 2 hours and after 24 hours. In: *Scandinavian Journal of Dental Research* 99 (1991), Nr. 6, S. 463–469
- [201] SABATINI, L. M. ; OTA, T. ; AZEN, E. A.: Nucleotide sequence analysis of the human salivary protein genes HIS1 and HIS2, and evolution of the STATH/HIS gene family. In: *Molecular Biology and Evolution* 10 (1993), Nr. 3, S. 497–511
- [202] SANDERINK, R. B. A.: *Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie*. Berlin u.a. : Quintessenz-Verl., 2004. – ISBN 3–87652–443–1
- [203] SARDIN, S. ; MORRIER, J.-J. ; BENAY, G. ; BARSOTTI, O.: *In vitro* streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. In: *Journal of Oral Rehabilitation* 31 (2004), Nr. 2, S. 140–148
- [204] SATOU, J. ; FUKUNAGA, A. ; MORIKAWA, A. ; MATSUMAE, I. ; SATOU, N. ; SHINTANI, H.: Streptococcal adherence to uncoated and saliva-coated restoratives. In: *Journal of Oral Rehabilitation* 18 (1991), Nr. 5, S. 421–429
- [205] SATOU, J. ; FUKUNAGA, A. ; SATOU, N. ; SHINTANI, H. ; OKUDA, K.: Streptococcal adherence on various restorative materials. In: *Journal of Dental Research* 67 (1988), Nr. 3, S. 588–591
- [206] SCANNAPIECO, F. A.: Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. In: *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 5 (1994), Nr. 3-4, S. 203–248
- [207] SCARANO, A. ; PIATTELLI, M. ; CAPUTI, S. ; FAVERO, G. A. ; PIATTELLI, A.: Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an *in vivo* human study. In: *Journal of Periodontology* 75 (2004), Nr. 2, S. 292–296
- [208] SCHAAL, K. ; YASSIN, A. ; STACKEBRANDT, E.: The Family Actinomycetaceae: The Genera *Actinomyces*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium*, *Varibaculum*, and *Mobiluncus*. In: DWORKIN, M. (Hrsg.) ; FALKOW, S. (Hrsg.) ; ROSENBERG, E. (Hrsg.) ; SCHLEIFER,

- K.-H. (Hrsg.) ; STACKEBRANDT, E. (Hrsg.): *The Prokaryotes*. Springer New York, 2006.  
– ISBN 978-0-387-30743-5, S. 430–537
- [209] SCHMALZ, G. ; FEDERLIN, M. ; GEURTSSEN, W.: Sind Keramik-Inlays und -Veneers wissenschaftlich anerkannt? In: *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 49 (1994), Nr. 3, S. 197–208
- [210] SCHÄHLE, Y.: *Genomische Diversität und Evolution von Virulenzdeterminanten in Streptococcus spp.*, Technischen Universität Kaiserslautern – Fachbereich Biologie, Diss., 2010
- [211] SHAHAL, Y. ; STEINBERG, D. ; HIRSCHFELD, Z. ; BRONSHTEYN, M. ; KOPOLOVIC, K.: *In vitro* bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials. In: *Journal of Oral Rehabilitation* 25 (1998), Nr. 1, S. 52–58
- [212] SHUMI, W. ; LIM, J. ; NAM, S.-W. ; LEE, K. ; KIM, S. ; KIM, M.-H. ; CHO, K.-S. ; PARK, S.: Environmental factors that affect *Streptococcus mutans* biofilm formation in a microfluidic device mimicking teeth. In: *BioChip Journal* 4 (2010), S. 257–263
- [213] SIEGRIST, B. E. ; BRECX, M. C. ; GUSBERTI, F. A. ; JOSS, A. ; LANG, N. P.: *In vivo* early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study. In: *Clinical Oral Implants Research* 2 (1991), Nr. 1, S. 38–46
- [214] SIGRIST-PHOTOMETER AG: *ABC der Prozessphotometrie – Fluoreszenzmessung*. <http://www.photometer.com/de/abc/show.html?q=Fluoreszenzmessung>. – (letzter Aufruf am 19.06.2011)
- [215] SKJØRLAND, K. K.: Bacterial accumulation on silicate and composite materials. In: *Journal De Biologie Buccale* 4 (1976), Nr. 4, S. 315–322
- [216] SKJØRLAND, K. K. ; RYKKE, M. ; SØNJU, T.: Rate of pellicle formation *in vivo*. In: *Acta Odontologica Scandinavica* 53 (1995), Nr. 6, S. 358–362
- [217] SPSS INC.: *Online Hilfe des Programms PASW-Statistics 18 (Version 18.0.0)*. – Einfaktorielle ANOVA: Post-Hoc-Mehrfachvergleiche
- [218] SREEBNY, L. M. ; ZHU, W. X. ; SCHWARTZ, S. S. ; MEEK, A. G.: The preparation of an autologous saliva for use with patients undergoing therapeutic radiation for head and neck cancer. In: *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 53 (1995), Nr. 2, S. 131–139

- [219] STEINBÜCHEL, A. ; OPPERMAN-SANIO, F. B. ; EWERING, C.: *Mikrobiologisches Praktikum. Versuche und Theorie*. Nachdr., Studienausg. Berlin u.a. : Springer, 2011 (Springer-Lehrbuch). – ISBN 9783642177026
- [220] STORM, R.: *Wahrscheinlichkeitsrechnung, mathematische Statistik und statistische Qualitätskontrolle*. 12. Aufl. München : Fachbuchverl. Leipzig im Carl-Hanser-Verl., 2007. – ISBN 978-3-446-40906-4
- [221] STOUT, K. J. ; BLUNT, L. ; DONG, W. P.: *Three-dimensional surface topography*. 2. ed. London : Penton Press, 2000. – ISBN 1857180267
- [222] STRÖBEL, R.: *Die Metalle. Werkstoffkunde mit ihren chemischen und physikalischen Grundlagen*. 20., überarb. Aufl. München : Neuer Merkur, 2009 (Grundwissen für Zahn-techniker, Teil Bd. 1). – ISBN 9783937346533
- [223] STRÖM, G. ; FREDRIKSSON, M. ; STENIUS, P.: Contact angles, work of adhesion, and interfacial tensions at a dissolving Hydrocarbon surface. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 119 (1987), Nr. 2, S. 352–361
- [224] SUTTON, S.: Measurement of Cell Concentration in Suspension by Optical Density. In: *Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter* 12 (2006), Nr. 8, S. 3–12
- [225] SVANBERG, M. ; MJÖR, I. A. ; ØRSTAVIK, D.: Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite and glass-ionomer restorations. In: *Journal of Dental Research* 69 (1990), Nr. 3, S. 861–864
- [226] SÖNJU, T. ; CHRISTENSEN, T. B. ; KORNSTAD, L. ; RÖLLA, G.: Electron microscopy, carbohydrate analyses and biological activities of the proteins adsorbed in two hours to tooth surfaces *in vivo*. In: *Caries Research* 8 (1974), Nr. 2, S. 113–122
- [227] SÖNJU, T. ; RÖLLA, G.: Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth *in vivo*. Rate of formation and amino acid analysis. In: *Caries Research* 7 (1973), Nr. 1, S. 30–38
- [228] TAKAHASHI, N. ; YAMADA, T.: Glucose and lactate metabolism by *Actinomyces naeslundii*. In: *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 10 (1999), Nr. 4, S. 487–503
- [229] TAN, K. ; PJETURSSON, B. E. ; LANG, N. P. ; CHAN, E. S. Y.: A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. In: *Clinical Oral Implants Research* 15 (2004), Nr. 6, S. 654–666

- [230] TANNER, J. ; VALLITTU, P. K. ; SÖDERLING, E.: Adherence of *Streptococcus mutans* to an E-glass fiber-reinforced composite and conventional restorative materials used in prosthetic dentistry. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 49 (2000), Nr. 2, S. 250–256
- [231] TEUGHEL, W. ; VAN ASSCHE, N. ; SLIEPEN, I. ; QUIRYNEN, M.: Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. In: *Clinical Oral Implants Research* 17, Suppl. 2 (2006), S. 68–81
- [232] TIWARI, D. K. ; BEHARI, J.: Biocidal Nature of Combined Treatment of Ag-nanoparticle and Ultrasonic Irradiation in *Escherichia coli* dh5. In: *Advances in Biological Research* 3 (2009), Nr. 3–4, S. 89–95
- [233] VAN DER MEI, H. C. ; RUSTEMA-ABBING, M. ; DE VRIES, J. ; BUSSCHER, H. J.: Bond Strengthening in Oral Bacterial Adhesion to Salivary Conditioning Films. In: *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2008), Nr. 17, S. 5511–5515
- [234] VAN DIJK, J. ; HERKSTRÖTER, F. ; BUSSCHER, H. ; WEERKAMP, A. ; JANSEN, H. ; ARENDS, J.: Surface-free energy and bacterial adhesion. An *in vivo* study in beagle dogs. In: *Journal of Clinical Periodontology* 14 (1987), Nr. 5, S. 300–304
- [235] VAN LOOSDRECHT, M. C. M. ; LYKLEMA, J. ; NORDE, W. ; ZEHNDER, A. J. B.: Bacterial Adhesion: A Physicochemical Approach. In: *Microbial Ecology* 17 (1989), Nr. 1, S. 1–15
- [236] VAN OSS, C. J.: *The properties of water and their role in colloidal and biological systems*. Amsterdam ; London : Elsevier/Academic Press, 2008 (Interface science and technology, Teil 16). – ISBN 978-0-12-374303-9
- [237] VAN OSS, C. J. ; GIESE, R. F. ; COSTANZO, P. M.: DLVO and non-DLVO interactions in hectorite. In: *Clays and Clay Minerals* 38 (1990), Nr. 2, S. 151–159
- [238] VAN PELT, A. W. J. ; VAN DER MEI, H. C. ; BUSSCHER, H. J. ; ARENDS, J. ; WEERKAMP, A. H.: Surface free energies of oral streptococci. In: *FEMS Microbiology Letters* 25 (1984), Nr. 2-3, S. 279–282
- [239] VERRAN, J. ; MARYAN, C.: Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. In: *The Journal of Prosthetic Dentistry* 77 (1997), Nr. 5, S. 535–539

- [240] VILINSKA, A. ; RAO, K. H.: Surface Thermodynamics and Extended DLVO Theory of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Cells Adhesion on Pyrite and Chalcopyrite. In: *The Open Colloid Science Journal* 2 (2009), S. 1–14
- [241] VITKOV, L. ; HANNIG, M. ; NEKRASHEVYCH, Y. ; KRAUTGARTNER, W. D.: Supramolecular pellicle precursors. In: *European Journal of Oral Sciences* 112 (2004), Nr. 4, S. 320–325
- [242] WALTON, T. R.: An up to 15-year longitudinal study of 515 metal-ceramic FPDs: Part 2. Modes of failure and influence of various clinical characteristics. In: *The International Journal of Prosthodontics* 16 (2003), Nr. 2, S. 177–182
- [243] WATERS, C. M. ; BASSLER, B. L.: Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21 (2005), Nr. 1, S. 319–346
- [244] WEERKAMP, A. H. ; UYEN, H. M. ; BUSSCHER, H. J.: Effect of zeta potential and surface energy on bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated human enamel and dentin. In: *Journal of Dental Research* 67 (1988), Nr. 12, S. 1483–1487
- [245] WELKER, D.: Prothesenkunststoffe. In: EICHNER, K. (Hrsg.) ; F., Kappert H. (Hrsg.): *Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung*. Thieme-Verlag Stuttgart New York, 2000, S. 211–250
- [246] WHITEHEAD, S. A. ; SHEARER, A. C. ; WATTS, D. C. ; WILSON, N. H. F.: Comparison of methods for measuring surface roughness of ceramic. In: *Journal of Oral Rehabilitation* 22 (1995), Nr. 6, S. 421–427
- [247] WHITLEY, J. Q. ; KUSY, R. P. ; MAYHEW, M. J. ; BUCKTHAL, J. E.: Surface roughness of stainless steel and electroformed nickel standards using a HeNe Laser. In: *Optics & Laser Technology* 19 (1987), Nr. 4, S. 189–196
- [248] WILLIAMS, C. J. ; KRAUS, F. W.: Sterilization and Storage of Saliva. In: *Journal of Dental Research* 42 (1963), Nr. 6, S. 1416–1428
- [249] WILLIAMS, N. B. ; POWLEN, D. O.: Human parotid saliva as a sole source of nutrient for microorganisms. In: *Archives of Oral Biology* 1 (1959), Nr. 1, S. 48–61
- [250] WILSON, M.: *Microbial inhabitants of humans : their ecology and role in health and disease*. Cambridge : Cambridge Univ. Press, 2005. – ISBN 0521841585
- [251] WINTERMANTEL, E. ; HA, S.-W.: *Medizintechnik. Life Science Engineering*. 5. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg., 2009. – ISBN 9783540939351; 9783540939368



- [252] WISS. DIENST, F&E IVOCAR (Hrsg.): *Wissenschaftliche Dokumentation IPS® Empress*. 1999
- [253] WYBER, J. A. ; ANDREWS, J. ; D'EMANUELE, A.: The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells. In: *Pharmaceutical Research* 14 (1997), Nr. 6, S. 750–756
- [254] YAO, Y. ; GROGAN, J. ; ZEHNDER, M. ; LENDENMANN, U. ; NAM, B. ; WU, Z. ; COSTELLO, C. E. ; OPPENHEIM, F. G.: Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. In: *Archives of Oral Biology* 46 (2001), Nr. 4, S. 293–303
- [255] ZELLMER, A.: *Werkstoffkundliche Untersuchungen zur Belastbarkeit implantatgetragener Brücken aus IPS Empress 2*, Ludwig-Maximilians-Universität: Medizinische Fakultät, Diss., 2002
- [256] ZILLES, K. ; TILLMANN, B.: *Anatomie*. Berlin u.a. : Springer, 2010 (Springer-Lehrbuch). – ISBN 978-3-540-69481-6; 3-540-69481-1
- [257] ZIMMER, D. ; GERDS, T. ; STRUB, J. R.: Überlebensraten von IPS-Empress®2-Vollkeramikronen und -brücken: Drei-Jahres-Ergebnisse. In: *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin* 114 (2004), Nr. 2, S. 115–119



# Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Gerhard Handel meinen besonderen Dank für die Überlassung des Themas und die großzügige Bereitstellung der Arbeitsmittel und Räumlichkeiten der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Universität Regensburg aussprechen.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. Sebastian Hahnel, der mich bei der Durchführung dieser Arbeit stets mit seinem Wissen, seiner Geduld und seinen zahlreichen wertvollen Anregungen bei der Erstellung und Korrektur des Manuskripts unterstützt hat.

Für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanke ich mich bei Frau MTA Gerlinde Held, die mir bei der Durchführung der Versuche mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist.

Mein herzlicher Dank geht an Frau Dr. Eva Eckert und Herrn Dr. Ernst Herreiner, in deren Praxis ich meine Zeit als Vorbereitungsassistentin in freundlicher und vertrauter Atmosphäre verbringen darf. Ihr verständnisvolles und offenes Wesen zeigten sie stets auch gegenüber der Fertigstellung meiner Dissertation.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem geliebten Freund Patryk Jurkowski, der mir nicht nur bei der Erstellung der Graphiken und Abbildungen mit unendlicher Geduld und all seinem Können die größtmögliche Hilfe war, sondern auch mein Leben Tag für Tag mit glücklichen Momenten bereichert.

Nicht zuletzt danke ich meinen geliebten Eltern Alfred und Beate Wislsperger. Alles, was ich bisher erreicht habe, war nur durch ihre Liebe und Unterstützung möglich.



# Lebenslauf

Name: Birgit Verena Wislsperger  
Anschrift: Zeppelinstraße 33b  
86807 Buchloe  
Geburtsdatum: 07.05.1986  
Geburtsort: Dingolfing  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulausbildung:

Sept. 1992 – Jul. 1996 Grundschule Gottfrieding  
Sept. 1996 – Jun. 2005 Gymnasium Dingolfing  
24. Juni 2005 Allgemeine Hochschulreife

## Studium:

Okt. 2005 – Nov. 2010 Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg  
12. Oktober 2006 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
10. April 2008 Zahnärztliche Vorprüfung  
25. November 2010 Zahnärztliche Prüfung  
15. Dezember 2010 Approbation als Zahnärztin

## Berufstätigkeit:

seit 01. April 2011 Vorbereitungsassistentin in der Gemeinschaftspraxis  
Dr. Eckert und Dr. Herreiner in Dietmannsried